



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETEÇÃO DE VÍRUS DE EXCREÇÃO FECAL EM PINÍPEDES DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

ANA CATARINA FOGAÇA ESTEVES ANTÓNIO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida
Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil
Dra. Carla Anne Flanagan

ORIENTADOR

Dra. Carla Anne Flanagan

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETEÇÃO DE VÍRUS DE EXCREÇÃO FECAL EM PINÍPEDES DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

ANA CATARINA FOGAÇA ESTEVES ANTÓNIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

Dra. Carla Anne Flanagan

ORIENTADOR

Dra. Carla Anne Flanagan

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira

Duarte

2017
LISBOA

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus. Pelo dom da vida, e pela graça de me presentear todos os dias com pessoas maravilhosas que se cruzam no meu caminho e me ajudam a traçá-lo.

Em segundo primeiro lugar: obrigada família, pelo apoio incondicional.

Obrigada avó Adelaide e avô Manuel pelo amor, e por me ensinarem “a ir para a frente”. Obrigada avó Lena por me lembrares sempre que “veterinária é a profissão mais linda do mundo”. Obrigada pai e mãe por todo o suporte, e por acreditarem em mim, nos meus sonhos e ambições. Obrigada tios queridos e Francisquinha, por me ensinarem que a felicidade está nas pequenas coisas da vida. Obrigada aos meus bisavós e à minha tia Né pelo orgulho, confiança e amizade. Obrigada ao meu irmão Pablo pela autoestima, porque saber que se é a “melhor maninha do mundo” não é para qualquer um. E ainda um obrigado muito sentido a quem foi duplamente minha família durante 6 longos meses, tia Maria e tio Dionísio, prima Margarida, Bia e David.

E em terceiro primeiro lugar, agradecer a quem me viu cair tanto durante estes 6 anos, mas que nunca se cansou de me levantar. A quem nunca desistiu, e me fez nunca desistir. Este é o fim de uma etapa maravilhosa e o começo de uma nova ainda melhor. E que a façamos sempre a dois como até aqui. Obrigada, Tomás.

Agradecer a preciosa ajuda na realização desta dissertação à minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Isabel Simões Duarte. Sem todo o seu empenho e disponibilidade não teria de todo sido possível.

A toda a equipa veterinária do Zoomarine que me acompanhou ao longo de 6 meses por terras algarvias, que me viu crescer e que me ensinou o encanto do trabalho num parque zoológico. Em particular, obrigada Raquel pela amizade e compreensão, e pelo companheirismo inigualável na luta da recolha das amostras. Obrigada Nuno e Joana pela conjugação ímpar e feliz de momentos de riso e boa disposição com trabalho em equipa. Obrigada Nieta por todos os ensinamentos (veterinários e ambientais) e pela partilha de uma família (com cão e tudo!) que por tantas vezes foi também minha. Obrigada Rita, por não me teres deixado só nesta que foi a mais bela temporada “escravária” de sempre! E em especial, obrigada Dra. Carla Flanagan, por ter aceite ser minha orientadora, pelos inúmeros ensinamentos, por não se cansar dos repetidos “porquês” e pelo contributo incalculável na minha formação não só profissional, como pessoal.

Aos amigos de sempre: Daniela, Varandas, Afro, Jaouhar, Carlos e ainda Marta, Bea e André, por dizerem sempre que “sim”, por estarem sempre “lá”.

Aos melhores colegas de Faculdade que alguém pode ter, que mais do que amigos se tornaram “Empresa”, *leia-se*, um conjunto de almas que sozinhas são excelentes, mas que juntas são mil vezes melhor: a “amiguinha” Domingues, o “colega” André, e a “idosa” Ana Sá. Obrigada Maria Joana, por toda a amizade e pela caminhada em conjunto na descoberta do que realmente importa. Obrigada Sónia, Marlene, Gomes, Neves, Diogo e Susana, por terem sido parte integrante deste percurso. Pelas discussões científicas e filosóficas, pelos almoços vegetarianos, pelas horas no Tagus, e pelo companheirismo e entreaajuda. Tenho a certeza que seremos os melhores médicos veterinários do mundo!

I must also be grateful to all the people who trusted me, who helped me in the most extreme situations in faraway (although beautiful) places, who led me to dream and who taught me the importance and magnificence of wildlife. Thank you Kevin Robinson and Gary Haskins! Thank you CRRU.

Thank you Paulien Buenskoe for all the knowledge, open mind and friendship. It was really worth it! To the “Dolfinarium” staff for teaching me the routine of working with aquatic animals. And a huge thanks to all the SOS Dolfijn team: Eligius, Babette, Anemarie, Jolanda, Bianca and Sophie for all the passion and willpower! Keep on going!

Por fim um enorme agradecimento a quem possibilitou, de diferentes formas, a concretização prática e diária deste trabalho: aos treinadores dos pinípedes do Zoomarine, Márcia, Lucie, Nádea, Ticha, Viegas, Adérito, Fábio e Guilherme; ao Miguel Silveira e a toda a equipa/família Zoomarine, incluindo obviamente os animais que fazem com que todo este trabalho valha a pena!; ao Aquário Vasco da Gama; aos colegas do laboratório de Virologia, Inês Félix, Carolina Bento, Clara Cartaxeiro e aos colegas do CIISA, pelo apoio técnico e disponibilização de materiais; ao André Pereira, ao Professor Doutor Ricardo Parreira e à Professora Doutora Aida Esteves do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilização dos conhecimentos e materiais que permitiram que este projeto desse verdadeiros frutos. A todos vós, o meu muito obrigado.

RESUMO

Deteção de vírus de excreção fecal em pinípedes de coleções zoológicas

As recentes técnicas de sequenciação genómica têm permitido aumentar o conhecimento acerca do viroma fecal dos pinípedes, sem contudo estar ainda esclarecida a sua associação ou não a eventos de doença, prevalência em diferentes populações, e distribuição no ambiente aquático. O presente trabalho laboratorial teve como principal objetivo a realização de um rastreio de vírus de excreção fecal, designadamente astrovírus, sapovírus e bocavírus através da amplificação de sequências nucleotídicas específicas por PCR convencional, em duas coleções zoológicas de pinípedes: do Zoomarine, no Algarve, e do Aquário Vasco da Gama, em Lisboa.

De uma população de 19 pinípedes de 4 espécies [8 otárias sul-africanas (*Arctocephalus pusillus pusillus*), 6 leões-marinhos californianos (*Zalophus californianus*), 4 focas comuns (*Phoca vitulina*) e 1 foca cinzenta (*Halichoerus grypus*)] obtiveram-se 3 sequências positivas a astrovírus (15.7%) cuja especificidade foi confirmada através de uma análise BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estas sequências foram obtidas através da utilização de *primers* que flanqueiam regiões conservadas da RdRp, a polimerase viral, codificada pelo domínio da ORF1b dos astrovírus, pela técnica de RTsn-PCR. A análise filogenética de 41 sequências aminoacídicas representativas dos dois géneros taxonómicos virais revelou que as sequências obtidas formaram um agrupamento independente com um valor de *bootstrap* estatisticamente robusto (96%).

Este trabalho representa o primeiro relato da deteção de astrovírus em amostras fecais das espécies otária sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*) e foca comum (*Phoca vitulina*) a nível mundial e em ambiente zoológico, tendo ainda promovido a realização de estudos epidemiológicos sobre agentes virais em populações de mamíferos marinhos mantidos sob cuidados humanos.

Palavras-chave: Astrovírus, sapovírus, bocavírus, pinípedes, zoológico.

ABSTRACT

Virus detection in faecal samples of pinnipeds in a zoological context

Recent techniques of genomic sequencing have increased the knowledge regarding the faecal viroma of pinnipeds. However, its association with disease events, prevalence in different populations and distribution in the aquatic environment are not fully characterized. In order to collect information regarding faecal viruses in pinnipeds, faecal samples from two zoological collections: Zoomarine, in Algarve, and Vasco da Gama Aquarium, in Lisbon, were collected and a molecular survey for astrovirus, sapovirus and bocavirus was conducted by conventional PCR.

From a total of 19 pinnipeds of 4 different species [8 Cape fur seals (*Arctocephalus pusillus pusillus*), 6 California sea lions (*Zalophus californianus*), 4 Harbour seals (*Phoca vitulina*) and 1 Grey seal (*Halichoerus grypus*)], 3 positive samples for astrovirus were identified (15.7%) and the specificity of the amino-acidic sequences was compared by BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Primers targeting the conserved regions of astrovirus RdRp, the viral polymerase, encoded by the ORF1b domain were used in a RT-snPCR assay. The phylogenetic analysis of 41 amino-acidic sequences representative of the two taxonomic genera, revealed an independent cluster of the Portuguese sequences with a significant bootstrap value (96%).

This work presents the first report of astrovirus detection on faecal samples from Cape fur seal (*Arctocephalus pusillus pusillus*) and Harbour seal (*Phoca vitulina*) species, in a global level and in a zoological context. It also prompted to future epidemiological studies regarding viral pathogens in marine mammal populations under human care.

Key words: astrovirus, sapovirus, bocavirus, pinnipeds, zoological.

LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Alguns dos resultados obtidos durante a execução do trabalho laboratorial que deu origem à presente Dissertação de Mestrado foram apresentados num encontro científico (Anexo 1):

- Fogaça, C.; Flanagan, C.; Urbani, N.; Fernandes, R.; Silva, J.; Monteiro, R.; Tavares, L.; Duarte, A. (2016) – Detecção de astrovírus em amostras fecais de pinípedes em contexto zoológico. 3rd EAZWV Iberian Section Meeting. Oceanário de Lisboa, 11 e 12 de novembro de 2016. Comunicação oral.

ÍNDICE

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	1
1. Estágio de natureza profissional no parque oceanográfico Zoomarine	1
2. Estágio de natureza profissional no Dolfinarium de Hardewijk e no centro de reabilitação de cetáceos SOS Dolfijn	5
3. Estágio em atividades de investigação no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-ULisboa.....	6
II. INTRODUÇÃO.....	7
Vírus em pinípedes.....	9
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1. Astrovírus	12
1.1 Introdução	12
1.2 Taxonomia, evolução e emergência	12
1.3 Epidemiologia	17
1.4 Patogénese.....	18
1.5 Organização Molecular e Genómica.....	21
1.6 Diagnóstico	25
2. Sapovírus	26
2.1 Introdução.....	26
2.2 Taxonomia, Evolução e Emergência	26
2.3 Epidemiologia	27
2.4 Patogénese.....	29
2.5 Organização Molecular e Genómica.....	30
2.6 Diagnóstico	32
3. Bocavírus	33
3.1 Introdução.....	33
3.2 Taxonomia, Evolução e Emergência	33
3.3 Epidemiologia	35
3.4 Patogénese.....	37
3.5 Organização Molecular e Genómica.....	39
3.6 Diagnóstico	41
IV. DETEÇÃO DE VÍRUS DE EXCREÇÃO FECAL EM PINÍPEDES DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS	42
1. Objetivos do Estudo.....	43
2. Material e Métodos	44
2.1 Caracterização da população em estudo	44
2.2 Caracterização das amostras, processamento e armazenamento	46
2.3 Extração de ácidos nucleicos.....	47
2.4 Amplificação de ácidos nucleicos.....	47
2.5 Sequenciação de DNA e análise de sequências nucleotídicas e aminoacídicas	53
3. Resultados	55
3.1 Análise dos produtos de amplificação.....	55
3.1.1 Produtos de amplificação utilizando <i>primers</i> específicos para astrovírus.....	55
3.1.2 Produtos de amplificação utilizando <i>primers</i> específicos para sapovírus.....	58
3.1.3 Produtos de amplificação utilizando <i>primers</i> específicos para bocavírus.....	59
3.2 Análise dos produtos sequenciados	60
3.3 Análise dos resultados em função das variáveis em estudo.....	61
3.4 Análise filogenética.....	61
V. DISCUSSÃO	65
VI. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	73
VII. BIBLIOGRAFIA	76
VIII. ANEXOS	91

Anexo 1 – Resumo da Comunicação Científica apresentada na 3rd EAZWV Iberian Section Meeting de 11 a 12 de novembro de 2016 no Oceanário de Lisboa.....	91
Anexo 2 – Modelo de registo das colheitas das amostras fecais recolhidas durante o período de Estágio Curricular no Zoomarine.....	92
Anexo 3 – Quantificação do total de ácidos nucleicos (DNA e RNA) presentes nas amostras em estudo por espectrofotometria.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espécies representativas dos diferentes habitats encontrados no parque oceanográfico Zoomarine.	2
Figura 2. Colheita de sangue numa foca comum sem recurso a contenção.	5
Figura 3. Entre 2014 e 2015 cerca de 170 focas foram mortas para proteger a indústria do salmão.	8
Figura 4. Alinhamento filogenético com base nas sequências nucleotídicas da RdRp, a polimerase viral, de 1259 astrovírus.	15
Figura 5. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de astrovírus.	22
Figura 6. Viriões de astrovírus humanos em fezes observados por microscopia eletrónica de contraste negativo.	22
Figura 7. Ilustração da organização genómica dos astrovírus.	23
Figura 8. Esquema ilustrativo do ciclo de replicação dos astrovírus.	24
Figura 9. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de sapovírus.	30
Figura 10. Fotografias de microscopia eletrónica de sapovírus a partir de amostras fecais humanas.	31
Figura 11. Diagrama representativo da organização genómica dos sapovírus.	32
Figura 12. Imagem de microscopia eletrónica de fase negativa de um bocavírus humano. .	39
Figura 13. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de bocavírus.	39
Figura 14. Organização genómica dos bocavírus.	40
Figura 15. Distribuição da população em estudo por espécies (em percentagem).	44
Figura 16. Distribuição da população em estudo por género (em percentagem).	44
Figura 17. Distribuição da população-alvo por faixas etárias (em percentagem).	45
Figura 18. Otária sul-africana numa instalação do Zoomarine.	45
Figura 19. Otária sul-africana na instalação do Aquário Vasco da Gama.	46
Figura 20. Esquema representativo de duas estratégias de amplificação de ácidos nucleicos: nPCR e snPCR.	48
Figura 21. Aspeto de um <i>BLASTx</i>	54
Figura 22. Produtos de amplificação de 9 amostras (A1-A7; Z1 e Z2) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.	55
Figura 23. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.	56
Figura 24. Produtos de amplificação de 19 amostras (A1-A8; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.	57
Figura 25. Produtos de reamplificação de 2 amostras (Z3 e A4) por RT-PCR em gel de agarose a 1,5%.	58
Figura 26. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por PCR em gel de agarose a 1,5%.	59
Figura 27. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por PCR em gel de agarose a 1,5%.	60
Figura 28. Árvore filogenética da RdRp dos astrovírus compreendendo 41 sequências aminoacídicas de astrovírus de diferentes espécies animais, entre elas as correspondentes às amostras A3, Z5 e P3.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies hospedeiras de astrovírus reportadas de 1975 a 2011.....	13
Tabela 2. Espécies de hospedeiros de astrovírus reportadas de 2010 até ao presente.	14
Tabela 3. Nomenclatura para representação de polinucleótidos segundo a IUPAC.	49
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de astrovírus e respetivas técnicas de amplificação.....	50
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de sapovírus e respetiva técnica de amplificação.....	50
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de bocavírus e respetivas técnicas de amplificação.....	51
Tabela 7. Ciclos térmicos utilizados na RT-PCR para os diferentes <i>primers</i> de astrovírus...52	
Tabela 8. Ciclos térmicos utilizados na RT-PCR para os <i>primers</i> de sapovírus.	52
Tabela 9. Ciclos térmicos utilizados na PCR para os diferentes <i>primers</i> de bocavírus.	52
Tabela 10. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de <i>primers</i> específicos para astrovírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.....	57
Tabela 11. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de <i>primers</i> específicos para sapovírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.	58
Tabela 12. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de <i>primers</i> específicos para bocavírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.	60
Tabela 13. Identificação das 38 sequências aminoacídicas utilizadas na construção da árvore filogenética com o respetivo número de acesso e nome do vírus.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus <i>Celsius</i>
µL	microlitro
µm	micrómetro
µM	micromoles
BLAST	do inglês, <i>Basic Alignment Search Tool</i>
BoAstV	Astrovírus bovino
CaAstV	Astrovírus canino
cDNA	DNA complementar
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CSL	Leões-marinhos californianos
CsISaV	do inglês, <i>California Sea Lion Sapovirus</i>
DAstV	Astrovírus de pato
DdDp	DNA polimerase dependente de DNA
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleótidos fosfatados
dsDNA	cadeia dupla de DNA
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
E-value	do inglês, <i>expected value</i>
FeAstV	Astrovírus felino
FMV-ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
GEA	Gastroenterite Aguda
gr	grama
ICTV	do inglês, <i>International Committee for the Taxonomy of Viruses</i>
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
IUPAC	do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	kilo pares de bases
kDa	kilo Dalton
L	litro
LCR	líquido cefalorraquidiano
LLC-PK1	do inglês, <i>Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney</i>
MAstV	<i>Mamastrovirus</i>
min	minuto(s)
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ML	critério da máxima verosimilhança
mL	mililitro
MuAstV	Astrovírus infetante na família <i>Murinae</i>
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>

ng	nano grama
NGS	do inglês, <i>Next Generation Sequencing</i>
NJ	critério de junção de vizinhos
nm	nanómetros
NOAA	do inglês, <i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i>
nPCR	<i>nested</i> PCR
Nsp	Proteína não-estrutural
OAstV	Astrovírus ovino
ORF	do inglês, <i>Open Reading Frames</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEC	do inglês, <i>Porcine Enteric Calicivirus</i>
PEMS	do inglês, <i>Poult Enteritis Mortality Syndrome</i>
pmol	picomole
PoAstV	Astrovírus de porco
poly (A)	Cauda de poliadenosinas
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	do inglês, <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
seg	segundo(s)
SNC	Sistema Nervoso Central
snPCR	<i>semi-nested</i> PCR
ssDNA	ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
ssRNA ⁺	ácido ribonucleico de cadeia simples com polaridade positiva
TAstV	Astrovírus de peru
VP	Proteína Viral
VPg	do inglês, <i>viral protein genome-linked</i>
xg	força centrífuga relativa

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

A realização do Estágio Curricular insere-se no Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa) e teve como objetivos a aprendizagem, o treino, e o aprofundamento de conhecimentos na área da medicina de mamíferos marinhos.

A presente Dissertação de Mestrado resulta de três componentes práticas:

- 1) um estágio curricular no Zoomarine (Mundo Aquático – Parques Oceanográficos de Entretenimento Educativo, S.A.) na Guia, região do Algarve, sob a orientação da Dra. Carla Flanagan;
- 2) um estágio de natureza profissional complementar ao primeiro, dividido em atividades realizadas no Dolfinarium e no centro de reabilitação de cetáceos SOS Dolfijn, ambos em Harderwijk, na Holanda, sob a orientação da Dra. Paulien Bunschoek;
- 3) um estágio em atividades de investigação no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), sob a orientação da Professora Doutora Ana Duarte.

1. Estágio curricular no parque oceanográfico Zoomarine

O Estágio Curricular no Zoomarine teve a duração de seis meses, compreendidos entre os dias 7 de setembro de 2015 e 28 de fevereiro de 2016, tendo sido perfeito um total de 945 horas na área de medicina de mamíferos marinhos, medicina de espécies exóticas e controlo populacional de gatos errantes.

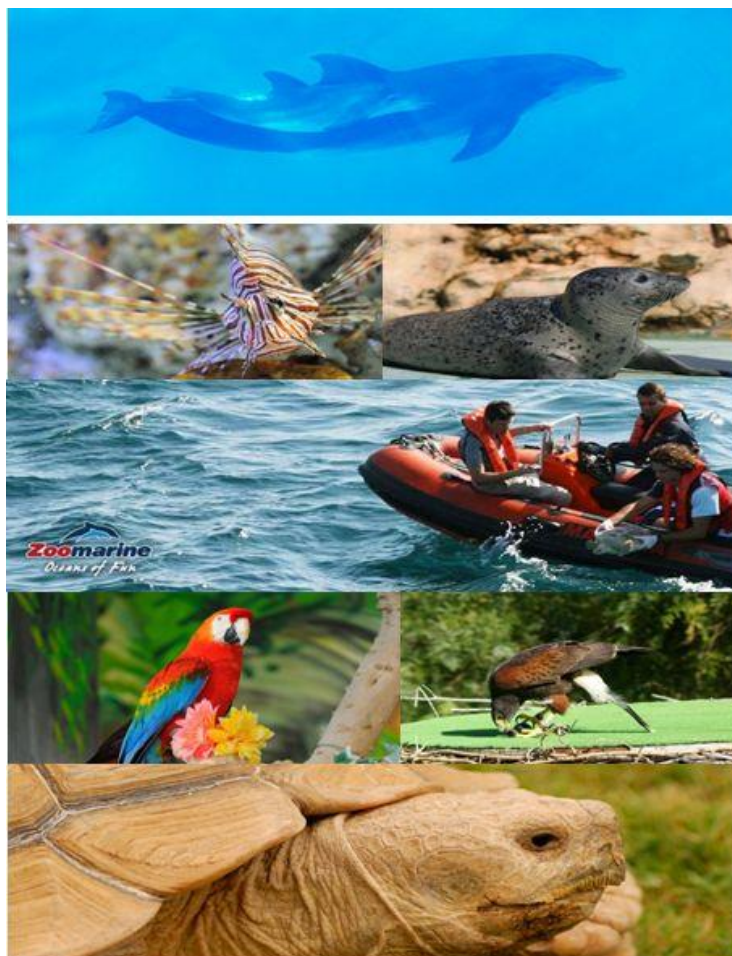
O Zoomarine caracteriza-se por ser um parque oceanográfico temático que se mantém fiel ao lema “Manter a Vida – Preservar a Natureza” e que por isso mesmo conjuga inovação e divertimento com uma vasta coleção zoológica representativa dos grandes ecossistemas da Terra, que engloba (Figura 1):

- aves de rapina, que executam voo livre durante as exposições;
- aves tropicais, que promovem a consciencialização para a proteção das florestas húmidas;
- aves do continente americano, inseridas num habitat de imersão;
- uma coleção de répteis terrestres e semi-aquáticos representativos das ordens Crocodilia e Testudinata;
- uma área de aquários com peixes ósseos e elasmobrânquios, representativa de mais de 20 ecossistemas;
- um centro de reabilitação de espécies marinhas, designado por Porto d’ Abrigo que se tem dedicado desde 2002 ao resgate, reabilitação e reintrodução ao meio natural de animais marinhos e aquáticos;
- uma coleção de pinípedes, da qual fazem parte leões-marinhos, otárias e focas;

- uma família de golfinhos-roazes que representa o *ex libris* do parque e que promove a preservação e a educação ambiental de uma forma divertida e apaixonada.

Figura 1. Espécies representativas dos diferentes habitats encontrados no parque oceanográfico Zoomarine.

Fonte: Zoomarine



Durante o período de estágio, a autora acompanhou diariamente a equipa veterinária na preparação e realização dos procedimentos médico-veterinários (preventivos e/ou curativos) com relação a qualquer espécie animal. Teve a oportunidade de participar diretamente nas seguintes atividades:

- Visita diária às diferentes áreas animais.
- Ações constantes do “Plano de Medicina Preventiva do Zoomarine”:
 - em golfinhos-roazes (*Turciops truncatus*): realização de exames físicos de estado geral; colheitas sanguíneas mensais e processamento para hematologia (contagens manuais na Câmara de Neubauer, contagem leucocitária diferencial e avaliação dos esfregaços) e provas bioquímicas; urianálise; análise citológica de conteúdo gástrico, respiratório, urina, fezes e leite; exames coprológicos; colheita de amostras para cultura microbiológica e/ou micótica (quando necessário);

vacinação semestral/anual contra *Erysipelothrix rhusiopathiae*; ecografias de controlo reprodutivo em fêmeas.

→ em pinípedes: realização de exames físicos de estado geral; colheitas sanguíneas trimestrais e processamento para hematologia (contagens manuais na Câmara de Neubauer, contagem leucocitária diferencial e avaliação dos esfregaços) e provas bioquímicas; urianálise; colocação de implantes hormonais em machos; ecografias abdominais de rotina.

→ no Porto d'Abrigo: realização de biometrias e colheitas de sangue em tartarugas-marinhas-comuns (*Caretta caretta*).

→ nos habitats da aves: exames de estado geral, microchipagem, corte de bico e de unhas, colheitas sanguíneas, sexagem, procedimentos endoscópicos (celoscopia, cloacoscopia, traqueoscopia, endoscopia digestiva); colheita anual de fezes para análise citológica, parasitológica e bacteriológica.

- Procedimentos diagnósticos/curativos: tratamento de lesões dérmicas em golfinhos-roazes e pinípedes; administração de injeções intramusculares em aves, golfinhos-roazes e num leão-marinho californiano; utilização de testes rápidos para testagem de *Mycobacterium* em pinípedes; auxílio na realização de uma biópsia com anestesia local prévia numa otária sul-africana; avaliação e tratamento de patologias oftálmicas em pinípedes; entubação e realização de injeções intramusculares em elasmobrânquios; sedação de tartarugas semi-aquáticas (*Trachemys scripta elegans*, *Trachemys scripta scripta*) para desbridamento de lesões de *shellrot* e tratamento de pododermatites; injeções intracardíacas em peixes para eutanásia; diagnóstico e ação terapêutica contra *Dermanyssus* no habitat de imersão.

- Diagnóstico por imagem: realização de radiografias e ecografias em golfinhos-roazes e em pinípedes (para diagnóstico de corpos estranhos e/ou patologia gastrointestinal); realização de radiografias numa tartaruga africana de esporas (*Centrochelys sulcata*) e em tartarugas-marinhas-comuns por suspeita de pneumonia, em tartarugas semi-aquáticas para diagnóstico de retenção de ovos e em diversas aves exóticas e de rapina por suspeita de fraturas e/ou para deteção de alterações ao nível do celoma; realização de ecocardiografias em focas-comuns e numa otária sul-africana por suspeita de dirofilariose; endoscopias em golfinhos-roazes e num leão-marinho (para diagnóstico de corpos-estranhos e/ou doença gastrointestinal).

- Procedimentos cirúrgicos: função de cirurgiã assistente aquando da realização de penectomias em tartarugas semi-aquáticas e de esterilizações eletivas em gatos errantes para controlo populacional.

- Internamento: acompanhamento de casos clínicos em tartarugas semi-aquáticas com *shellrot* e retenção de ovos, numa coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*) com lesões traumáticas, numa cacatua (*Cacatua galerita*) com inflamação/infeção celómica e numa

iguana verde (*Iguana iguana*) com doença óssea metabólica, e respetivos tratamentos, alimentações, limpezas, desinfecções e manutenção de espaços.

- Assistência aos treinadores durante os treinos médicos realizados nas coleções de mamíferos marinhos.

- Participação no “Plano de observação de fêmeas gestantes de golfinho-roaz do Zoomarine”: leitura de protocolos e participação numa sessão de esclarecimentos, utilização do programa de previsão da data de parto, auxílio na recolha de sangue para análises hormonais, preparação das fichas médicas com fármacos de emergência, participação em ecografias pré-parto diárias com realização de medições do feto (comprimento torácico e biparietal), medição diária da distância intermamária e da temperatura rectal, monitorização dos comportamentos pré e pós-parto, acompanhamento do momento do parto, recolha da placenta, avaliação da integridade da mesma e colheita de amostras para análises bacteriológicas.

- Participação no resgate de uma cria de golfinho-comum arrojada ao largo do Algarve, avaliação física e preparação de medicações.

- Preparação logística e transporte aquando da entrada de novos animais para o parque: avaliação do plano de quarentena, comunicação em paralelo com a Direção Geral de Agricultura e Veterinária (DGAV), receção de espécimes, participação no transporte em si, colheita de amostras para realização de testes pós-chegada, envio de amostras para o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).

- Procedimentos de necrópsia em mais de uma dezena de espécies de aves, peixes e répteis.

- Acompanhamento de colaboradores externos em visitas de consultadoria.

- Ação de formação sobre incêndios.

- Participação em atividades científicas: desenvolvimento do projeto de investigação que deu origem à presente Dissertação (elaboração dos protocolos, comunicação com os treinadores e demais intervenientes, recolha de amostras e processamento das mesmas); elaboração de um parecer sobre as características dos aditivos alimentares propostos para integrar os objetos de enriquecimento ambiental da coleção de golfinhos-roazes; acompanhamento do estudo sobre parasitas cardiopulmonares desenvolvido no parque, e que deu origem à tese de Mestrado da Dra. Inês Marcelino.

De salientar que os designados comportamentos médicos executados nos mamíferos marinhos e aqui descritos, correspondem na sua larga maioria a comportamentos voluntários, que possibilitam que exames médicos de grande valor diagnóstico e terapêutico sejam realizados sem recurso a contenção física ou química, privilegiando o bem-estar animal e possibilitando a avaliação médico-veterinária essencial à manutenção da saúde dos mesmos (Figura 2).

Figura 2. Colheita de sangue numa foca comum sem recurso a contenção.
Fotografia original.



Estas metodologias são conseguidas com base no treino animal, que assenta no conceito de condicionamento operante definido em 1953 pelo psicólogo Burrhus Skinner, e adaptado de forma pioneira (relativamente às restantes espécies animais) à realidade dos mamíferos marinhos sob cuidados humanos desde a década de 70 (Skinner, 2014). Refere-se ao processo pelo qual uma resposta é modelada através do reforço diferencial e de aproximações sucessivas, na medida em que cada comportamento gera uma consequência, e que esta consequência influencia a sua probabilidade de ocorrer novamente. Se o comportamento for reforçado, essa probabilidade aumenta; se for castigado, essa probabilidade diminuiu. Assim, no Zoomarine, todos os treinos animais são realizados por treinadores experientes a partir das técnicas do condicionamento operante baseado no reforço positivo (Neto, 2016), com particular destaque para os treinos médicos.

2. Estágio de natureza profissional no Dolfinarium de Hardewijk e no centro de reabilitação de cetáceos SOS Dolfijn

Como complemento ao primeiro estágio, a autora teve ainda a oportunidade de realizar, de 3 a 31 de março, um estágio no Dolfinarium de Harderwijk, na Holanda. Este espaço caracteriza-se por ser o maior parque de mamíferos marinhos da Europa e que acomoda dentro dos seus limites, um centro de reabilitação para cetáceos – SOS Dolfijn, que trabalha em colaboração com o parque, apesar de representarem entidades distintas. Assim, o trabalho desenvolvido ocorreu em simultâneo nos dois locais e as atividades desenvolvidas em concreto foram:

- Visita diária às diferentes áreas animais, nomeadamente: lagoa exterior com fêmeas e crias de golfinho-roaz e instalações interiores com machos da mesma espécie; instalação exterior com botos (*Phocoena phocoena*); lagoa exterior com uma população de focas cinzentas (*Halichoerus grypus*) e focas comuns (*Phoca vitulina*); instalação exterior com uma população de leões-marinheiros-de-Steller (*Eumetopias*

jubatus) e outra de leões-marinhos californianos (*Zalophus californianus*); uma instalação exterior com uma população de morsas (*Odobenus rosmarus*) e ainda o centro de reabilitação de cetáceos SOS Dolfijn.

- Realização de exames físicos de estado geral; colheitas sanguíneas; colheitas de amostras para cultura microbiológica e/ou micótica.
- Diagnóstico por imagem: realização de radiografias, ecografias, broncoscopias, rinoscopias, gastroscopias, colonoscopias e utilização da termografia.
- Participação no resgate e primeiros-socorros a 2 botos arrojados na costa Norte da Holanda e posteriormente transportados para o centro de reabilitação; acompanhamento de ambos os casos durante 3 semanas com intervenções médicas e de reabilitação.
- Participação na necrópsia de um boto arrojado vivo ao largo da Alemanha e transportado sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia e Virologia do Hospital Erasmus Medical Centre, Roterdão, sob a orientação da Dra. Lineke Begeman.
- Acompanhamento da médica veterinária do parque em serviços de consultoria veterinária ao santuário Ecomar, para botos e focas em reabilitação, no norte do país.
- Acompanhamento de trabalhos científicos a decorrer no parque oceanográfico sobre reprodução, anatomopatologia e farmacologia em mamíferos marinhos.

3. Estágio em atividades de investigação no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do CIISA

A realização do estágio no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do CIISA decorreu de abril a julho de 2016 e foi fundamental para a execução do trabalho proposto nesta dissertação. Houve a oportunidade de observar o funcionamento diário de um laboratório e contactar com a área de diagnóstico laboratorial tão presente na prática clínica médico-veterinária.

II. INTRODUÇÃO

As alterações climáticas e as modificações antropogénicas dos ecossistemas naturais, pelo seu carácter global e pela rapidez com que ocorreram nas últimas décadas, revestem-se de grande importância para as sociedades contemporâneas e os profundos impactos que daí têm resultado estendem-se a áreas como a economia, a justiça social, a biodiversidade e a saúde animal e pública. Nesta última vertente, as doenças infecciosas e parasitárias surgem em destaque, pois é precisamente esta alteração das complexas estruturas ecológicas observada ao nível dos ambientes naturais que é apontada como uma das grandes responsáveis pela emergência de novas doenças (Confalonieri, 2014).

Woolhouse e Gowtage-Sequeria (2005) no seu estudo, referem que as doenças de etiologia viral têm uma muito maior probabilidade de ser doenças emergentes, em especial as causadas por vírus de genoma RNA (ácido ribonucleico), graças aos processos de mutação e recombinação genómica a que estes vírus estão sujeitos. Assim se compreende que possam existir vírus com potencial poder patogénico ainda por identificar, em espécies e biótopos anteriormente não considerados, sendo os ecossistemas marinhos um exemplo disso mesmo.

O NOAA (do inglês, *National Oceanic and Atmospheric Administration*), um departamento governativo dos Estados Unidos da América (EUA), tem documentado desde 1990 arrojamentos designados “eventos mortais extraordinários” em mamíferos marinhos, sendo que 50% da etiologia dos mesmos é desconhecida, constando em alguns relatórios a designação de “vírus desconhecido” (Gulland *et al.*, 2005). Rosales e Thurber (2013) à luz da descoberta por metagenómica de novos vírus neurotrópicos responsáveis por um caso de encefalite num boto, reiteram a falta de conhecimento que existe acerca dos agentes patogénicos que circulam nos oceanos, especialmente de vírus potencialmente emergentes e/ou desconhecidos que podem ser responsáveis pelos arrojamentos individuais e em massa a que se tem assistido na última década. Mesmo com relação a vírus já conhecidos existe a necessidade de se realizarem mais estudos, pois muitas das vias de transmissão, estratégias replicativas e interações ao nível da célula hospedeira estão ainda pouco esclarecidos (Wellehan Jr, 2010).

Os mamíferos marinhos são animais de natureza gregária e com grande longevidade, estão no topo da cadeia trófica e têm uma distribuição global, e por isso são considerados excelentes animais sentinelas dos oceanos. Desta forma, a vigilância sanitária destes animais permite a identificação precoce de agentes infecciosos e o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e epidemiológicas viáveis para os combater (Marvulo & Carvalho, 2014). O facto de os pinípedes serem mamíferos marinhos que compartilham, na natureza, ambientes costeiros com os seres humanos, torna a avaliação epidemiológica nestas espécies bastante relevante (Bossart, 2011) num contexto de “*One world, one health*”. Acresce ainda o facto de

os pinípedes serem animais carismáticos e queridos do público em geral assumindo assim um papel de “embaixadores” das suas populações na natureza, o que propicia à chamada de atenção para o impacto negativo que o Homem tem infligido nos seus habitats naturais e nas populações selvagens (Confalonieri, 2014).

Atualmente as espécies de pinípedes mais ameaçadas do mundo são: o lobo-marinho (*Monarchus monarchus*) presente nas ilhas Desertas do Arquipélago da Madeira, a foca-monge-do-Hawáii (*Monarchus schauinslandi*) e a foca-do-mar-Cáspio (*Pusa caspica*), todas elas consideradas pela Lista Vermelha da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) como espécies em perigo de extinção (<http://www.iucnredlist.org>). As principais ameaças a estas espécies são: a subnutrição, por interferência humana ou não; as doenças infecciosas, enquanto causas naturais; o emaranhamento de fios de pesca derivado das artes pesqueiras que provoca muitas vezes asfixia; o plástico que dá origem a corpos estranhos gastrointestinais; a morte a tiro e o embate de grandes embarcações, como causas antropogénicas, que somam 8 a 10% das causas de admissão destes animais em centros de reabilitação (Bonn, 2015).

Por oposição, muitas outras espécies de pinípedes prosperam nos seus habitats, ainda que também elas sofram as consequências da proximidade dos seus territórios com as populações humanas. Estas interações, que por vezes perturbam as atividades e interesses humanos, podem mesmo resultar em perseguições, ferimentos e morte dos animais (Figura 3).

Figura 3. Entre 2014 e 2015 cerca de 170 focas foram mortas para proteger a indústria do salmão. Na fotografia: foca abatida a tiro em Gardenstown, Escócia.

Fonte: www.seashepherd.org.uk/images/news/2014/news-140427-1-2-Sea-Shepherd-UK-Offers-Reward-800w.jpg



O Decreto-Lei nº 263/81 de 3 de Setembro que diz respeito ao “Regulamento de Protecção dos Mamíferos Marinhos na Zona Costeira e Zona Económica Exclusiva Continental Portuguesa” é introduzido pelas seguintes afirmações:

Os mamíferos marinhos, integrantes do ecossistema marinho e de importância nas suas cadeias alimentares, são necessários ao equilíbrio ambiental e fazem parte da herança natural do homem e do património genético do mundo vivo.

As alterações morfológicas, anatómicas e funcionais que neles se operaram ao longo de milhares de anos conferem-lhes, por outro lado, elevado valor científico. Constituem, assim, uma parcela do mundo natural cuja manutenção é imperativa. (1981, p. 2344)

As instituições zoológicas contemporâneas que mantêm mamíferos marinhos sob cuidados humanos têm assim um papel protagonista nesta protecção dos mesmos, na consciencialização do público para a educação ambiental, na contribuição consistente para a conservação *ex situ* e na investigação científica pertinente aos aspetos relacionados direta ou indiretamente à conservação *in situ* (Confalonieri, 2014; IUCN, 2014).

Vírus em pinípedes

Os pinípedes são membros da ordem Carnivora, superfamília Pinnipedia que engloba mamíferos carnívoros encontrados exclusivamente em habitats aquáticos. O facto de serem animais gregários tende a favorecer a transmissão de vírus entre eles e com outras espécies animais com quem partilham os seus habitats costeiros (Li, Shan, *et al.*, 2011).

Conhecem-se diversos vírus capazes de infetar e causar doença em diferentes espécies de pinípedes, e alguns deles transmitidos a, ou a partir de mamíferos terrestres, como acontece com o calicivírus, o herpesvírus, o vírus da esgana das focas, entre outros esporadicamente relatados. Com relação aos vírus de excreção fecal, os rotavírus, adenovírus e astrovírus já foram identificados em algumas espécies de pinípedes (Dierauf, Lowenstine, & Jerome, 1981; Li, Shan, *et al.*, 2011; Rivera, Nollens, Venn-Watson, Gulland & Wellehan, 2010). Estes três vírus são designados genericamente de “vírus entéricos”, pois invadem e replicam-se ao nível da mucosa do intestino delgado causando inflamação local e consequentemente dando origem a gastroenterites agudas (Cowley, Donato, & Kirkwood, 2014).

Dados os avanços conseguidos em relação às técnicas de sequenciação genómica, vários são os trabalhos recentemente publicados a nível mundial que dizem respeito a vírus de excreção fecal em pinípedes. Entre os mais relevantes, podem encontrar-se os estudos de:

- Coria-Galindo *et al.*, (2009) que detetaram pela primeira vez anticorpos a rotavírus em soro, e o genoma do mesmo vírus em zaragatoas retais em duas espécies de otárias selvagens das Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis* e *Zalophus wolfebaeki*);
- Li, Shan, *et al.*, (2011) que identificaram por metagenómica *novel* vírus (ou seja, vírus geneticamente divergentes) presentes nas fezes de leões-marinhos californianos (*Zalophus californianus*) provenientes de 2 centros de reabilitação nos EUA;
- Kluge *et al.*, (2016) que identificaram por metagenómica *novel* vírus e vírus já anteriormente conhecidos, pela primeira vez em *Arctocephalus australis* e *Arctocephalus tropicalis*, duas espécies de otárias arrojadas ao largo do estado de Rio Grande do Sul, no Brasil.

No entanto, muito falta ainda conhecer acerca do viroma fecal dos pinípedes: a sua associação ou não a eventos de doença gastrointestinal, prevalência em populações mantidas sob cuidados humanos e em ambiente selvagem, e distribuição no ambiente aquático. O mesmo ocorre em Portugal, em que os dados existentes sobre vírus de excreção fecal nestas espécies são até à data e do conhecimento da autora, inexistentes, quer em ambiente selvagem, quer sob cuidados humanos (em centros de reabilitação ou parques zoológicos). Acrescem a estas motivações o facto de em ambiente zoológico, as perturbações gastrointestinais estarem entre as principais afeções clínicas que afetam os pinípedes, juntamente com problemas oftalmológicos, dermatológicos e consequências de traumatismos (Bonn, 2015; Colitz *et al.*, 2010; Rubio-Guerri *et al.*, 2015). Com relação às afeções gastrointestinais, estas são relativamente frequentes e podem ter origem em distúrbios ambientais, dietéticos, parasitários, virais ou bacterianos (Rubio-Guerri *et al.*, 2015). Estes eventos são normalmente autolimitantes e nem sempre se obtém um diagnóstico definitivo (Rivera *et al.*, 2010).

Por todos estes motivos, há a necessidade de se investir continuamente na ciência e em particular no estudo dos vírus entéricos e no seu significado clínico nas várias populações de pinípedes.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica foi elaborada de acordo com o planeamento do trabalho laboratorial. Este teve por base o artigo científico de Li, Shan, *et al.* (2011) “*The Fecal Viral Flora of California Sea Lions*” que descreve os resultados obtidos através das técnicas de NGS (do inglês, *Next Generation Sequencing*) para análise do viroma fecal de 3 grupos de leões-marinhos californianos provenientes do estado selvagem e de um centro de reabilitação na Califórnia, EUA.

De seguida apresenta-se uma sumária revisão bibliográfica acerca dos vírus rastreados, designadamente, astrovírus, sapovírus e bocavírus, de acordo com as principais publicações científicas publicadas nos últimos anos.

1. Astrovírus

1.1 Introdução

Os astrovírus são vírus de genoma RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ssRNA⁺), e constituem uma descoberta relativamente recente, tendo sido primeiramente reportados em 1975 por microscopia eletrónica, a partir de fezes de crianças com manifestações clínicas de gastroenterite, e descritos como partículas arredondadas de pequena dimensão (Appleton & Higgins, 1975). No mesmo ano, Madeley e Cosgrove denominaram estas partículas virais de “astrovírus”, devido à sua aparência com uma estrela (*astron*, em grego). Estudos posteriores de Kurtz e Lee (1978) e de Kurtz, Lee, Craig e Reed (1979) comprovaram respetivamente, a presença de títulos positivos a astrovírus em crianças, e a capacidade infecciosa deste vírus de transmissão oro-fecal. A primeira sequência genómica foi obtida em 1992 a partir de um astrovírus humano (Major, Eglin, & Easton, 1992; Willcocks & Carter, 1992) e apenas em 1995, o ICTV (do inglês, *International Committee for the Taxonomy of Viruses*) reconheceu definitivamente a família *Astroviridae* (Murphy, 1995).

A família *Astroviridae* infecta uma ampla variedade de hospedeiros, entre os quais o homem, sendo um agente comum de gastroenterite aguda (GEA) em crianças, surtos de doença ou mesmo infeções nosocomiais; gera impactos económicos negativos ao nível da produção pecuária e é também um agente a considerar ao nível da saúde pública (Brown *et al.*, 2015; Mendenhall, Smith, & Vijaykrishna, 2015; Wunderli *et al.*, 2011).

1.2 Taxonomia, evolução e emergência

A família *Astroviridae* está dividida em 2 géneros: o género *Avastrovirus*, que infeta espécies de aves, e o género *Mamastrovirus*, que infeta espécies de mamíferos; e porque desde 2008 o número de espécies hospedeiras quadruplicou (De Benedictis, Schultz-Cherry, Burnham & Cattoli, 2011), a classificação taxonómica dentro desta família ganhou alguma complexidade. Atualmente o ICTV reconhece 3 espécies incluídas no género *Avastrovirus* (designadas por *Avastrovirus* 1 a 3) e 19 espécies incluídas no género *Mamastrovirus* (designadas por *Mamastrovirus* 1 a 19), sendo que a revisão elaborada pelo *Astroviridae Study Group* em Junho de 2011 reclassificou este último género com base em critérios filogenéticos (pela comparação das sequências aminoacídicas da totalidade da proteína da cápside viral), ao invés de se basear apenas no nome da espécie hospedeira (Bosch, Pintó & Guix, 2014; ICTV, 2011).

Também em 2011, De Benedictis e colaboradores, elaboraram uma listagem na qual constavam 22 espécies animais ou famílias de animais suscetíveis à infeção por astrovírus, incluindo animais domésticos, cinantrópicos e selvagens, aves e mamíferos de ambientes terrestres e aquáticos (Tabela 1). Porém, os últimos cinco anos foram recheados de novas descobertas, que muito graças às mais recentes técnicas de sequenciação, catapultaram o

conhecimento que se tinha acerca dos astrovírus, e por isso mesmo, à data desta dissertação, acrescem a essa lista pelo menos mais 40 espécies de animais um pouco por todo o mundo (Tabela 2).

Assim, ao longo dos últimos anos, tem-se sucessivamente demonstrado que a família *Astroviridae* possui uma enorme diversidade genética até então desconhecida (Cordey *et al.*, 2016; Pativada, Bhattacharya, & Krishnan, 2013; Vu, Cordey, Brito, & Kaiser, 2016) (Tabelas 1 e 2; Figura 4).

Tabela 1. Espécies hospedeiras de astrovírus reportadas de 1975 a 2011.
Adaptado de De Benedictis *et al.*, 2011.

Espécie	Ano 1ª Detecção	Referência
Humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	1975	Madeley & Cosgrove, 1975
Ovino (<i>ovis aries</i>)	1977	Snodgrass & Gray, 1977
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	1978	Woode & Bridger, 1978
Galinha (<i>Gallus gallus</i>)	1979	Yamaguchi, Imada, & Kawamura, 1979
Porco (<i>Sus scrofa</i>)	1980	Bridger, 1980
Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	1980	Williams, 1980
Perú (<i>Meleagris meleagris</i>)	1980	McNulty, Curran, & McFerran, 1980
Gato (<i>Felis catus</i>)	1981	Hoshino, Zimmer, Moise, & Scott, 1981
Veado-vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	1981	Tzipori, Menzies, & Gray, 1981
Pato (<i>Anas platyrhynchos domestica</i>)	1984	Gough, Collins, Borland, & Keymer, 1984
Rato (<i>Mus musculus</i>)	1985	Kjeldsberg & Hem, 1985
Vison (<i>Neovison vison</i>)	2002	Englund, Chriel, Dietz, & Hedlund, 2002
Galinha-d'Angola (<i>Numida meleagris</i>)	2005	Cattoli <i>et al.</i> , 2005
Morcegos insectívoros¹	2008	Chu <i>et al.</i> , 2008
Chita (<i>Acinonyx jubatus</i>)	2009	Atkins <i>et al.</i> , 2009
Leão-marinho californiano (<i>Zalophus californianus</i>)	2010	Rivera <i>et al.</i> , 2010
Leão-marinho-de-steller (<i>Eumelopias jubatus</i>)	2010	Rivera <i>et al.</i> , 2010
Golfinho-roaz (<i>Tursiops truncatus</i>)	2010	Rivera <i>et al.</i> , 2010
Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>)	2010	Chu <i>et al.</i> , 2010
Corço (<i>Capreolus capreolus</i>)	2010	Smits <i>et al.</i> , 2010

¹ Foram detetados astrovírus em zaragatoas rectais de vários morcegos insectívoros, pertencentes a diferentes famílias, nomeadamente *Rhinolophidae*, *Vespertilionidae*, *Emballonuridae* e *Myotis*.

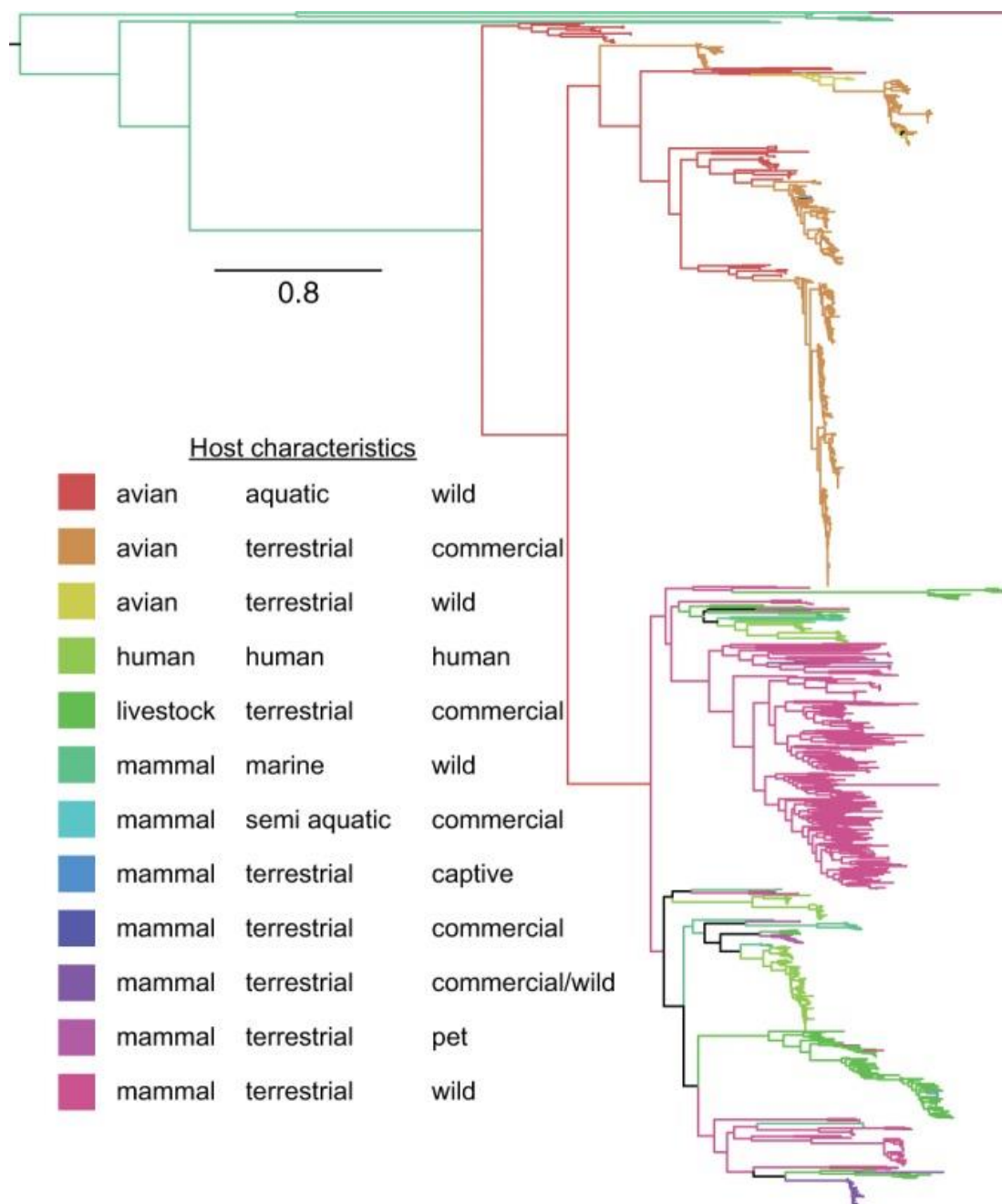
Tabela 2. Espécies de hospedeiros de astrovírus reportadas de 2010 até ao presente.

Espécie	Ano	Local	Referência
Baleia-anã (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>)	2010	EUA	Wellehan Jr, 2010
Orca (<i>Orcinus orca</i>)	2010	EUA	Wellehan Jr, 2010
Cachalote-pigmeu (<i>Kogia breviceps</i>)	2010	EUA	Wellehan Jr, 2010
Golfinho comum (<i>Delphinus delphis</i>)	2010	EUA	Wellehan Jr, 2010
Coelho europeu (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	2011	Itália	Martella, Moschidou, Lorusso <i>et al.</i> , 2011
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	2011	China	Zhao <i>et al.</i> , 2011
Rato-de-pescoço-amarelo (<i>Apodemus flavicollis</i>)	2012	Hungria	Farkas, Fey, Keller, Martella, & Egyed, 2012
Aves aquáticas migratórias ²	2012	Hong Kong e Camboja	Chu <i>et al.</i> , 2012
Ratinho de laboratório C57BL/6J (Sub-família <i>Murinae</i>)	2012	EUA	Yokoyama, Loh, <i>et al.</i> , 2012
Javali (<i>Sus scrofa</i>)	2012	Hungria	Reuter, Nemes, <i>et al.</i> , 2012
Dromedário (<i>Camelus dromedarius</i>)	2014	Dubai	Woo <i>et al.</i> , 2014
Morcegos³	2014	China	Hu <i>et al.</i> , 2014
Pequenos roedores⁴	2014	China	Hu <i>et al.</i> , 2014
Musaranho-cinzento-asiático (<i>Crocidura attenuata</i>)	2014	China	Hu <i>et al.</i> , 2014
Musaranho-da-montanha (<i>Episoriculus leucops</i>)	2014	China	Hu <i>et al.</i> , 2014
Pika tibetana (<i>Ochotona thibetana</i>)	2014	China	Hu <i>et al.</i> , 2014
Aves limícolas (inespecificado)	2014	EUA	Honkavuori <i>et al.</i> , 2014
Primatas⁵	2015	Bangladesh e Camboja	Karlsson <i>et al.</i> , 2015
Monarca azul (<i>Hypothymis azurea</i>)	2015	Camboja	Mendenhall, Yaung, <i>et al.</i> , 2015
laque (<i>Bos grunniens</i>)	2015	Tibete	Chen <i>et al.</i> , 2015
Rolieiro europeu (<i>Coracias garrulus</i>)	2015	Hungria	Pankovics, Boros, Kiss, Delwart, & Reuter, 2015
Ganso (<i>Anser anser</i>)	2015	China	Liao, Liu, Wang, Wang, & Zhang, 2015

² 9 espécies diferentes³ 10 espécies diferentes⁴ 4 espécies diferentes⁵ 3 espécies diferentes

Figura 4. Alinhamento filogenético com base nas sequências nucleotídicas da RdRp, a polimerase viral, de 1259 astrovírus.

Fonte: Mendenhall, Smith *et al.*, 2015.



A diversidade de astrovírus presente em cada um dos nichos ecológicos é evidenciada pelas cores dos ramos da árvore consoante as características do hospedeiro.

Sabe-se hoje que uma mesma espécie hospedeira é suscetível à infeção por diferentes linhagens genéticas pertencentes à família *Astroviridae* (Bosch *et al.*, 2014). Este facto tem sido reportado sobretudo em humanos (Bosch *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2013; Kapoor, Li, *et al.*, 2009), mas também em espécies animais. Exemplos disso mesmo são: a presença em

morcegos de linhagens de astrovírus geneticamente divergentes entre si, congregadas num mesmo hospedeiro (Chu, Poon, Guan & Peiris, 2008; Zhu *et al.*, 2009); a descoberta de pombos co-infetados com o astrovírus da nefrite aviária e com um astrovírus de galinha num surto ocorrido na China (Zhao *et al.*, 2011); a detecção de um *novel* astrovírus em rato que partilha >50% da sua sequência da RdRp, a RNA polimerase dependente de RNA (do inglês, *RNA-dependent RNA polymerase*), com os astrovírus humanos MLB1 e MLB2, apoiando a hipótese de um ancestral comum entre os dois (Phan *et al.*, 2011); a estreita relação entre estirpes de astrovírus de porco e uma nova sequência de astrovírus encontrada em ratinhos-de-laboratório nos EUA e em ratos selvagens na Hungria (Yokoyama, Loh, *et al.*, 2012); e a detecção recente de uma elevada proporção de suínos e bovinos co-infetados por duas ou mais linhagens de astrovírus (Tse *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2013).

Por outro lado em 2015, Mendenhall, Smith *et al.*, com base na análise filogenética da RdRp viral de pelo menos 80 espécies de astrovírus anteriormente descritos na literatura, de ambos os géneros taxonómicos (Figura 4), sugerem que o padrão evolutivo destes vírus pode ter sido determinado pela transmissão cruzada entre espécies que foi ocorrendo em distintos cenários ecológicos. Ainda segundo os mesmos autores, a circulação continuada de várias estirpes virais dentro de uma população, proporciona a infeção de hospedeiros das populações vizinhas, da mesma ou de outras espécies animais. Ambientes como os designados ecótonos, que consistem em áreas de transição ambiental onde diferentes comunidades ecológicas estabelecem contacto, são tidas em consideração nesta matéria e consideradas áreas de grande oportunidade para a ocorrência destes fenómenos. E é precisamente graças a esta capacidade, que muitos investigadores sugerem que alguns astrovírus humanos possam periodicamente emergir de uma transmissão zoonótica (De Benedictis *et al.*, 2011; Kapoor, Li, *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2013).

Exemplos mais recentes que pretendem atestar esta hipótese remetem para o estudo de Meyer e colaboradores (2015) realizado no Quênia e na Gâmbia com 949 amostras fecais de crianças, nas quais várias sequências nucleotídicas apresentaram uma identidade de 92-95% com sequências de astrovírus caninos e de aves, o que pode ser resultado da ingestão de alimentos crus, da exposição ambiental por parte do homem a estes vírus animais ou de um evento de recombinação. Também recentemente, Karlsson e colaboradores (2015) demonstraram que um mesmo hospedeiro pode comportar vírus dos dois géneros (*Avastrovirus* e *Mamastrovirus*), a partir da identificação de uma grande variedade de astrovírus de aves e de mamíferos (inclusive astrovírus humanos) em primatas no Bangladesh e no Camboja, colocando em discussão a eventual passagem da barreira da espécie.

1.3 Epidemiologia

Os astrovírus são agentes infecciosos transmitidos por via fecal-oral e a exposição ao agente pode ocorrer através do contacto direto com fezes infetadas, ou indiretamente através de fomites (Abad *et al.*, 2001) ou ainda, através do consumo de alimentos crus e águas contaminadas. Este vírus adquire portanto mais significado ao nível da saúde pública na medida em que está associado a surtos gastroentéricos em escolas (Mitchell *et al.*, 1995; Oishi *et al.*, 1994), unidades de saúde (Gallimore *et al.*, 2005), e inclusivamente a um exercício militar em Portugal (Lopes-João *et al.*, 2015), bem como associado à utilização pública de uma piscina exterior em Helsínquia (Maunula, Kalso, Von Bonsdorff, & Ponka, 2004).

A transmissão ambiental de astrovírus foi já apoiada por alguns autores que mencionam a estabilidade por períodos prolongados deste agente em água potável (Abad, Pinto, Villena, Gajardo, & Bosch, 1997), em água doce e salgada (Bosch, Pintó, Villena, & Abad, 1997) e em águas superficiais e subterrâneas (Abad *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2008), sendo que estas últimas são utilizadas como fontes de água para consumo humano. Por esta razão, os astrovírus são considerados agentes causadores de morbilidade gastrointestinal para a maioria da população humana, tendo sido inclusivamente proposta a adição deste vírus ao painel de testes que verifica a qualidade da água de abastecimento público em França (Gofti-Laroche *et al.*, 2016).

Segundo estudos *in vitro* de Abad e colaboradores (2001) os astrovírus humanos são capazes de persistir com potencial infeccioso durante 60 dias em material inerte (como a cerâmica) e durante 90 dias em material poroso (como o papel) a uma temperatura entre 4 e 20°C, e com uma humidade relativa de 90±5%. Segundo Kurtz e Lee (1987) são estáveis a pH ácido, sobrevivem a 60°C durante 5 minutos e são resistentes à inativação pelo álcool.

A maioria da informação epidemiológica conhecida é gerada com base em astrovírus humanos. Nestes, as infeções afetam principalmente crianças com menos de 2 anos de idade e são responsáveis por até 10% das gastroenterites não bacterianas (Bosch *et al.*, 2014; Herrmann, Taylor, Echeverri, & Blacklow, 1991), sendo o astrovírus o 3º agente viral de diarreia aguda mais comum depois do rotavírus e do norovírus (Vu *et al.*, 2016). Mesmo na ausência de sintomatologia entérica, os astrovírus são agentes frequentemente presentes nas fezes de crianças entre os 0 e os 24 meses (Platts-Mills *et al.*, 2015).

Em adultos saudáveis a doença é normalmente autolimitante num espaço de 2 a 4 dias (Jeong, Jeong, & Cheon, 2012; Wunderli *et al.*, 2011) e a deteção de anticorpos oscila entre os 65-100% da população, dependendo da estirpe (Burbelo *et al.*, 2011; Holtz *et al.*, 2014; Kurtz *et al.*, 1979). Apesar de afetarem predominantemente a população pediátrica, como referido, têm sido cada vez mais reportadas infeções em idosos e em doentes imunocomprometidos (Finkbeiner, Allred, *et al.*, 2008; Quan *et al.*, 2010; Sebire *et al.*, 2004). Os astrovírus humanos clássicos estão distribuídos um pouco por todo o mundo, com uma incidência superior nos países em desenvolvimento (GIDEON Informatics & Berger, 2016) e

uma incidência média mundial de 11% (Bosch *et al.*, 2014). Em relação à sazonalidade da infecção, há informações contraditórias, mas tudo leva a crer que as infecções esporádicas ocorram em qualquer estação, sendo contudo mais prevalentes no Inverno (Pativada *et al.*, 2012).

Os astrovírus estão também associados a doença entérica em animais jovens, tais como vitelos, borregos, leitões, cães, gatos e visons (Pantin-Jackwood, Spackman & Day, 2008).

Um estudo recente realizado num abrigo para gatos nos EUA mostrou que os astrovírus são dos agentes entéricos virais mais prevalentes (Zhang *et al.*, 2014), indo de encontro ao estudo realizado em Portugal, sobre o viroma fecal felino, que refere a elevada incidência (40%) de co-infecções com rotavírus, bocavírus, sakobuvírus e picornavírus (Ng *et al.*, 2014).

Também os astrovírus encontrados em suínos têm uma distribuição mundial (De Benedictis *et al.*, 2011) e segundo Luo e colaboradores (2011) que testaram amostras fecais em explorações e conteúdos intestinais em matadouro, a sua prevalência pode chegar aos 80%. Em bandos de aves domésticas os astrovírus são também considerados vírus comuns e foram detetados em 78% dos bandos de perús com manifestações de doença entérica (Reynolds, Saif, & Theil, 1987).

1.4 Patogénese

Em humanos a manifestação clínica típica de GEA por astrovírus consiste em diarreia aquosa ligeira e pode estar associada a vômitos, febre, dores abdominais, anorexia e dores de cabeça (De Benedictis *et al.*, 2011). O período de incubação médio é de 4,5 dias (Lee *et al.*, 2013) e já se demonstrou que a excreção fecal de vírus pode ser atípica e prolongar-se por 9 meses (Wunderli *et al.*, 2011). Quer em crianças quer em adultos estão descritas infeções assintomáticas aquando da infeção por astrovírus humanos clássicos, e desconhece-se ainda o papel enquanto agentes etiológicos de gastroenterite, dos novos serotipos de astrovírus humano MLB e HMO/VA (Finkbeiner, Holtz, *et al.*, 2009; Finkbeiner, Li, *et al.*, 2009; Finkbeiner, Kirkwood, & Wang, 2008; Kapoor, Li, *et al.*, 2009).

A correlação entre as diferentes estirpes de astrovírus e parâmetros como a carga viral, duração da excreção ou a gravidade da doença, ainda não foram convenientemente analisados (Bosch *et al.*, 2014).

Relatórios recentes mostraram evidência de que 3 espécies do género *Mamastrovírus* (MAstV 1, serotipo 4; MAstV6 serotipos MLB1 e MLB2; e MAstV9 serotipo HMO-C/VA1) se podem disseminar no organismo de forma sistémica causando virémia, tendo sido consideradas como causas únicas de infeções ao nível do sistema nervoso central (SNC) que em alguns casos conduziram à morte dos doentes (Vu *et al.*, 2016). Estes dados aliados à deteção de astrovírus humano MLB2 no plasma e na nasofaringe de uma criança com uma infeção do aparelho respiratório superior (Holtz *et al.*, 2011) permite a vários autores acreditar que a patogenicidade de alguns astrovírus humanos se estende a outros tecidos extra-entericos,

podendo até haver tropismo para outro tipo de células ou sistema ainda não detetado, e que a sua presença nas fezes possa ser apenas uma consequência do modo de transmissão (Brown *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2016). Naccache *et al.* (2015) vai mais longe e trata este vírus em semelhança com o que se sabe sobre o vírus da poliomielite, em que a infeção é maioritariamente assintomática (90-95%) ou associada a diarreia aguda autolimitante, com demonstração de doença grave apenas em casos raros.

Nesta linha de pensamento, também nas espécies animais a demonstração de que este vírus se pode disseminar para além do trato gastrointestinal tem sido uma constante. Desde logo ainda na década de 80, Gough, Collins, Borland e Keymer (1984) descreveram os astrovírus de pato (DAstV) como causa de hepatites fatais em crias de 1 a 2 semanas de vida. Alguns anos depois, um astrovírus foi identificado como agente etiológico do já anteriormente (erradamente classificado) vírus da nefrite aviária que afeta principalmente os rins de galos jovens, mas que também pode ser detetado ao nível do fígado, baço, pâncreas, jejuno e reto (Imada *et al.*, 2000). Trabalhos mais recentes com ratinhos-de-laboratório demonstraram também a disseminação de astrovírus infetante na família *Murinae* (MuAstV) ao nível do baço, fígado e rins (Yokoyama, Loh, *et al.*, 2012). Ainda mais interessantes são os achados de astrovírus no SNC quer de bovinos, quer de visons, que originam lesões semelhantes aos descritos em humanos. Blomström, Widén, Hammer, Belák e Berg (2010) descreveram pela primeira vez um astrovírus no tecido cerebral de um vison, na Dinamarca, Suécia e Finlândia, após um surto neurológico ocorrido em 2000-2001 nesta mesma espécie, que apresentava sinais clínicos como tremores e ataxia, tendo sido denominado de *Shaking Mink Syndrome-Astovirus*. Nos últimos dois anos, dois artigos foram publicados com referência ao efeito neurotrópico dos astrovírus de bovinos (BoAstV) e de novas estirpes, em casos de encefalites mortais em bovinos na Suíça (Bouzalas *et al.*, 2014) e na Alemanha (Schlottau *et al.*, 2016), demonstrando que estes vírus anteriormente apenas associados a doença entérica, têm capacidade infecciosa ao nível do SNC.

Nas espécies ovina, bovina, suína e canina, os astrovírus OAstV, BoAstV, PoAstV e CaAstV, respetivamente, parecem não ter um papel preponderante nas enterites virais, induzindo apenas quadros diarreicos ligeiros a moderado. Contudo, a presença ou não de sintomatologia gastrointestinal associada à excreção deste agente é controversa (Gray, Angus, & Snodgrass, 1980; Marshall *et al.*, 1987; Tse *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2013).

Em cães, estudos na Coreia do Sul, França e Itália não correlacionam a presença de CaAstV com episódios de diarreia (Choi, Lim, *et al.*, 2014; Grellet *et al.*, 2012; Martella, Moschidou, Lorusso *et al.*, 2011) contrariando o estudo ocorrido na China em que apenas os animais sintomáticos foram positivos à deteção do vírus (Zhu *et al.*, 2011).

Em gatos o astrovírus felino (FeAstV) pode ser identificado quer em animais sintomáticos, quer assintomáticos, e normalmente induz um quadro de doença entérica autolimitante. Contudo está descrito um caso de uma cria com 4 meses de idade com um quadro grave de

gastreenterite por FeAstV, mas simultaneamente infetado com o vírus da panleucopénia felina (Moschidou *et al.*, 2011). Esta mesma autora considera assim importante que se integre o astrovírus no algoritmo diagnóstico de gastroenterite em gatos, mesmo que este surja em concomitância com outros agentes.

O artigo que reporta a identificação de astrovírus em chitas criadas sob cuidados humanos, teve origem na investigação de casos súbitos de sintomatologia gastrointestinal grave caracterizada por letargia, anorexia, diarreia aquosa e regurgitação (Atkins *et al.*, 2009).

Num período de 3 anos, Drexler e colaboradores (2011) identificaram em morcegos, diferentes padrões de amplificação de astrovírus, sendo que apesar de terem concluído que este vírus atua como um agente infeccioso de baixa patogenicidade, detetaram dois picos de maior excreção, nomeadamente aquando do momento de formação inicial da colónia em que o tamanho e densidade da mesma foram fatores decisivos, e aquando do nascimento das novas crias.

Em ratinhos-de-laboratório, num estudo de Kjeldsberg e Hem (1985) em que se observou uma elevada prevalência de astrovírus em animais assintomáticos, sugeriu-se pela primeira vez que estes animais pudessem albergar o vírus e apenas manifestar doença em caso de imunossupressão.

Quanto aos mamíferos marinhos, apenas o estudo alargado com golfinhos-roazes que fazem parte de um programa de treino militar da marinha norte-americana na Califórnia, correlaciona a excreção do vírus com o comportamento anormal dos animais, reportado pelos treinadores, sem correlação direta com quadros de doença gastrointestinal (Wellehan Jr, 2010). No artigo de Rivera e colaboradores (2010) dos 5 animais positivos a astrovírus, apenas um leão-marinho californiano apresentava diarreia, e nessa amostra foi ainda possível isolar *Salmonella sp.*, pelo que o poder patogénico do vírus não foi clarificado.

Noutras espécies, porém, os quadros entéricos são mais complexos. Em visons, por exemplo, os astrovírus são importantes fatores de risco na apresentação clínica do síndrome de diarreia pré-desmame (Mittelholzer, Englund, Hedlund, Dietz, & Svensson, 2003). Esta é uma doença altamente infecciosa e dissemina-se rapidamente dentro da exploração. Caracteriza-se por febre, diarreia profusa com duração de até 10 dias, pelagem molhada devido à excessiva excreção das glândulas apócrinas e desidratação nos casos mais graves. Este síndrome já foi reportado em muitos países e a magnitude do prejuízo é elevadíssima, considerando não só o número de mortes, como a desvalorização das pelagens (Hammer *et al.*, 2012).

Os astrovírus têm ainda sido sucessivamente associados a doença entérica e a um aumento da mortalidade em vários grupos de aves, como perus jovens, frangos e galinhas-d'Angola (*Numida meleagris*) (Baxendale & Mebatsion, 2004; Cattoli *et al.*, 2005; Guy, Miles, Smith, Fuller, & Schultz-Cherry, 2004). Os astrovírus de peru (TAstV) estão associados ao síndrome designado por PEMS (em inglês, *poult enteritis mortality syndrome*), uma doença grave sobretudo em animais jovens, que causa sinais clínicos como diarreia e depressão acentuada

do crescimento e que está na origem de prejuízos económicos elevados na indústria de criação de perus (Pantin-Jackwood *et al.*, 2008).

Como evidenciado, as variações ao nível dos sinais clínicos e manifestação de doença são muitíssimo variados dependendo das espécies e das estirpes em questão.

A patogénese dos astrovírus ainda não foi completamente elucidada. Existem controvérsias entre estudos *in vitro* e modelos animais no que diz respeito à morte celular (Guix, Bosch, Ribes, Martínez, & Pintó, 2004; Koci *et al.*, 2003), sendo que este último foi conduzido em perus infetados com a estirpe TAsTV-2, em que apesar da grave sintomatologia apresentada pelos animais, os quadros lesionais não eram coincidentes, uma vez que as alterações histopatológicas intestinais mostraram ser apenas ligeiras. Também em humanos, estudos decorridos até aos dias de hoje demonstram alterações histológicas insignificantes com inflamação intestinal pouco evidente, durante o período de infeção (Sebire *et al.*, 2004; Vu *et al.*, 2016) sugerindo que a reação inflamatória ao nível da mucosa intestinal pode não ser a reação primária que dá origem ao processo diarreico. Moser, Carter e Schultz-Cherry (2007) demonstraram anos antes, a partir de estudos *in vitro*, que a infeção por astrovírus origina um aumento da permeabilidade da barreira epitelial independentemente da ocorrência de replicação viral, mas altamente dependente da cápside viral. Também num outro estudo em perus, sugere-se que a infeção por este vírus provoque uma redistribuição dos transportadores específicos de sódio nas células epiteliais, causando má-absorção deste ião (Nighot, Moeser, Ali, Blikslager, & Koci, 2010). Estes dados explicam parcialmente o mecanismo de indução da diarreia osmótica que caracteriza a infeção por astrovírus, sem contudo existir até à data um consenso. A replicação viral parece ocorrer nos dois terços apicais das vilosidades intestinais, mas também foi reportada em macrófagos presentes na lâmina própria (Moser & Schultz-Cherry, 2005 *in* Vu *et al.*, 2016).

1.5 Organização Molecular e Genómica

Os viriões de astrovírus são partículas pequenas, com 28 a 30nm de diâmetro, sem invólucro lipídico e com uma cápside de simetria icosaédrica constituída por 180 subunidades proteicas (12 pentâmeros e 20 hexâmeros) e por 30 espículas proeminentes à superfície (Bosch *et al.*, 2014) (Figura 5).

Quando observados ao microscópio eletrónico estes viriões apresentam uma forma de estrela de 5 a 6 pontas, que segundo Madeley (1979) era distintiva. Contudo hoje sabe-se que estas projeções podem estar apenas presentes em 10% dos viriões (Koci & Schultz-Cherry, 2002), pelo que esta aparência externa pode não ser assim tão facilmente reconhecida (Figura 6).

Figura 5. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de astrovírus.
Adaptado de www.viralzone.expasy.org/all_by_species/27.html

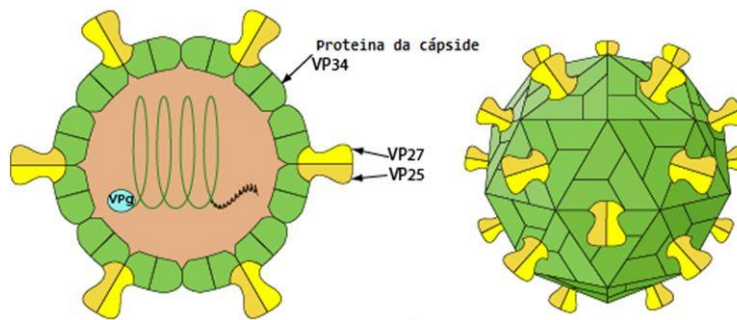
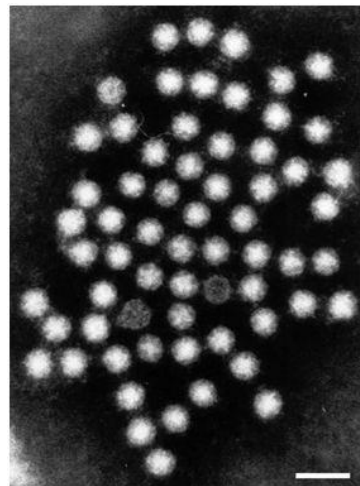


Figura 6. Viriões de astrovírus humanos em fezes observados por microscopia eletrônica de contraste negativo. A barra horizontal do canto inferior direito representa uma medida de 50nm.

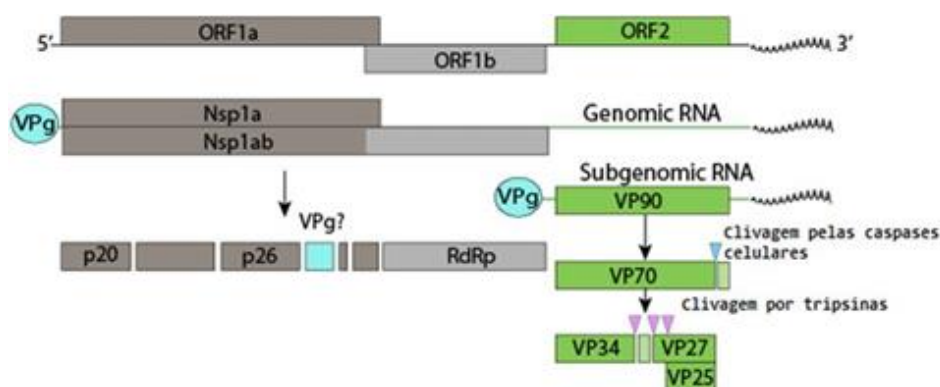


O genoma dos astrovírus é constituído por uma molécula de ssRNA+, de aproximadamente 6.8kb, variando entre 6.1 a 7.9kb conforme as estirpes (Jiang *et al.*, 2013 in Méndez & Arias, 2007). Os vírus com este tipo de genoma, pertencem à classe IV da Classificação de Baltimore (1971), na qual estão incluídos vírus que possuem genomas lineares com a mesma polaridade do RNA mensageiro (RNAm) viral (+) e que portanto, têm a capacidade de iniciar a tradução proteica imediatamente após a sua entrada no citoplasma das células infectadas, sendo por isso considerados infecciosos por si mesmo (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2009).

O genoma dos astrovírus apresenta três grelhas de leituras abertas (ou ORF, do inglês *open reading frames*): ORF1a, ORF1b e ORF2. Da tradução destes genes resultam três poliproteínas: duas proteínas não-estruturais (Nsp) – Nsp1a e Nsp1ab, que após diversas clivagens por caspases celulares originam proteases, a RdRp e outras proteínas não-estruturais através de um mecanismo designado por *ribosomal frameshifting* (Lewis & Matsui, 1997; Marczinke *et al.*, 1994); e a proteína estrutural da cápside – a proteína viral (VP) VP70. A ORF2 é expressa a partir de RNA subgenómico que origina primeiramente uma VP

percursora com 90kDa (kilo Dalton) de peso molecular (a VP90), que é clivada por caspases celulares, e a VP70 que daí resulta é também ela clivada por tripsinas dando origem às VP da cápside dos viriões com potencial infeccioso (Méndez, Fernández-Luna, López, Méndez-Toss & Arias, 2002) (Figura 7).

Figura 7. Ilustração da organização genómica dos astrovírus.
Adaptado de www.viralzone.expasy.org/all_by_species/27.html



Em termos evolutivos, a pressão seletiva sobre as proteínas enzimáticas e estruturais do vírus foi distinta, resultando numa maior diversidade genética do extremo 5' da ORF2 em relação à ORF1a e 1b e ao extremo 3' da ORF2 (Lukashov & Goudsmit, 2002; Simmonds, 2006). Por isso mesmo, se encontram distâncias filogenéticas tão díspares quando se avaliam sequências nucleotídicas correspondentes a cada uma destas regiões, sendo que a ORF2 apresenta maior variabilidade (van Hemert, Lukashov, & Berkhout, 2007) e a RdRp e a porção 3' da cápside são as regiões mais conservadas nos astrovírus (van Hemert *et al.*, 2007).

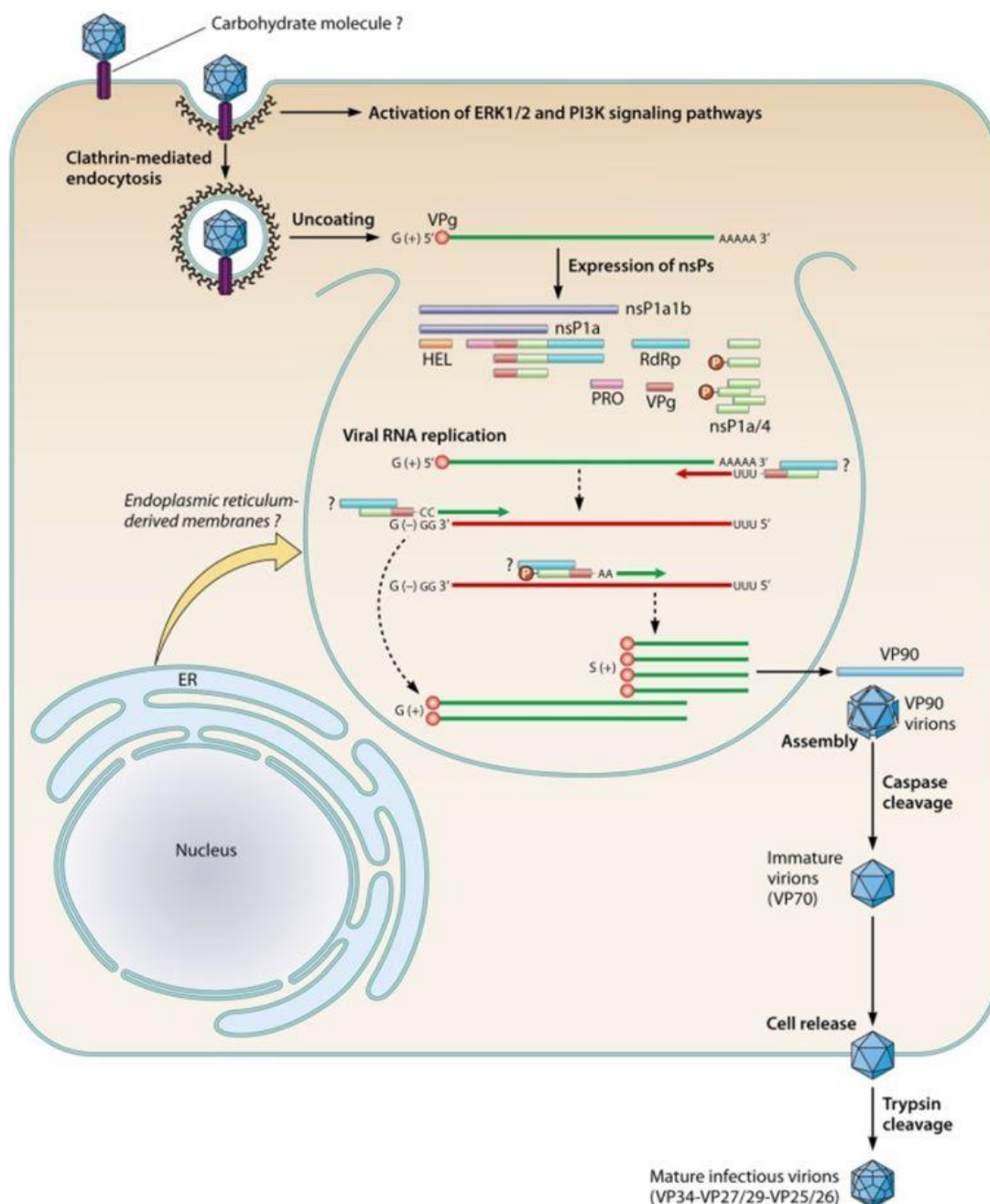
A replicação dos astrovírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira. Após a ligação do virião aos recetores da membrana citoplasmática, a entrada do virião por endocitose é mediada pela clatrina, uma proteína que participa na formação de vesículas membranares no citoplasma, presente ao nível do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi (Donelli, Superti, Tinari, & Marziano, 1992; Méndez *et al.*, 2014). Após descapsidação, promovida por uma descida do pH, e libertação do genoma viral no citoplasma, inicia-se a tradução da ORF1a e 1b com produção da RdRp.

A RNA polimerase viral é responsável pelo início da replicação do RNA genómico viral, sintetizando a cadeia não codificante, de polaridade negativa, que vai servir de molde para a síntese de RNA genómicos virais e para a síntese de RNA subgenómicos tardios. Posteriormente, durante a montagem dos novos viriões, a cápside é formada pela proteína precursora VP90, que após clivagem por caspases celulares e dá origem à VP70 (del Rocío

Banos-Lara & Méndez, 2010; Guix, Caballero, Bosch, & Pintó, 2004). O virião   finalmente libertado da célula hospedeira por mecanismos ainda desconhecidos, mas que se pensa que não envolvam lise celular. A maturac o dos novos viriões e subsequente forma o dos viriões maduros com capacidade infecciosa e cujas proteínas da cápside são denominadas por VP34-VP27/29-VP25/26 ocorre no espaço extracelular por a o da tripsina (Méndez, Salas-Ocampo, & Arias, 2004). Esta sequência de acontecimentos encontra-se ilustrada na Figura 8.

Figura 8. Esquema ilustrativo do ciclo de replica o dos astrovírus.

Fonte: Bosch *et al.*, 2014.



1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de astrovírus é desafiante em qualquer espécie, pois a sintomatologia clínica pode assumir diferentes características e intensidades. Os achados histopatológicos são maioritariamente pouco específicos, ainda que possa daí resultar um diagnóstico definitivo, se se aliarem técnicas como a microscopia eletrónica para observação de efeito citopático e/ou a imunohistoquímica (Sebire *et al.*, 2004). Também a microscopia eletrónica de contraste negativo pode ser utilizada individualmente para observação dos viriões nas fezes, ainda que este procedimento seja laborioso e especializado, exija concentrações elevadas de partículas nas fezes, tendo ainda a limitação já referida de apenas 10% dos viriões exibirem a característica forma de estrela de pontas.

No entanto, muitas têm sido as técnicas atualmente utilizadas e disponíveis para medicina humana, nomeadamente os *kits* ELISA (ensaios imunoenzimáticos) (Huhulescu *et al.*, 2008) ou a demonstração do antígeno viral em testes de imunocromatografia (desenvolvidos e testados por Khamrin *et al.* (2010) com 100% de sensibilidade e 91.2% de especificidade), ou as técnicas de diagnóstico molecular, como a RT-PCR (do inglês, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) ou a *real-time* RT-PCR (que consiste numa amplificação em tempo real, também designada de RT-PCR quantitativa) e considerada por Royuela, Negredo, e Sanchez-Fauquier (2006) significativamente mais sensível que a cultura celular. Esta variante da PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) segue os princípios anteriormente descritos, mas implica menor manipulação das amostras, e permite uma maior rapidez na obtenção de resultados uma vez que se elimina o passo de eletroforese em gel de agarose. Atualmente a utilização da PCR multiplex permite identificar vários agentes patogénicos entéricos (bactérias, parasitas e vírus) em simultâneo, sendo as estirpes de astrovírus humano clássicas aí incluídas (Bosch *et al.*, 2014).

Contudo, o *gold standard* do diagnóstico para astrovírus continua a ser o isolamento viral em cultura de células, em combinação com um pré-tratamento com tripsina (Bosch *et al.*, 2014). No entanto, e apesar da propagação de alguns astrovírus humanos já ter sido conseguida em diferentes culturas celulares (Brinker, Blacklow, & Herrmann 2000; Willcocks, Ashton, Kurtz, Cubitt, & Carter, 1994), o isolamento do vírus não é praticável para todas as estirpes, sendo mesmo considerado um vírus de difícil isolamento (Bosch *et al.*, 2014).

2. Sapovírus

2.1 Introdução

Os sapovírus são vírus de genoma RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ssRNA⁺), pertencentes à família *Caliciviridae*, com poder infeccioso em humanos e em animais e responsáveis por surtos ou casos esporádicos de GEA em todo o mundo, sendo por isso mesmo considerados um problema ao nível da saúde pública (Oka, Wang, Katayama, & Saif, 2015).

Os sapovírus foram primeiramente identificados em 1976 por microscopia eletrónica no Reino Unido em fezes diarreicas humanas, por Madeley e Cosgrove, tendo sido nos anos subsequentes reconhecidos como agentes patogénicos responsáveis por casos de doença gastroentérica (Chiba *et al.*, 1979; Mcswiggan, Cubitt, & Moore, 1978).

Contudo, a estirpe “protótipo” do género Sapovírus, ou seja, aquela sobre a qual se estudaram primeiramente as características moleculares e genómicas (Numata, Hardy, Nakata, Chiba, & Estes, 1997), provém de um outro surto de gastroenterite decorrido num orfanato, na localidade de Sapporo, no Japão, alguns anos mais tarde (Chiba *et al.*, 1979).

2.2 Taxonomia, Evolução e Emergência

Em 2002, foi redigida uma proposta ao ICTV para atribuição de 2 novos géneros à família *Caliciviridae*, tendo sido atribuído o nome de *Norovirus* ao género provisoriamente descrito como vírus de Norwalk, bem como o nome de *Sapovirus* ao género provisoriamente descrito em inglês por “*Sapporo-like viruses*” ou “*typical human caliciviruses*” (Mayo, 2002).

Segundo o ICTV (2011), a família *Caliciviridae* contempla os seguintes 5 géneros: *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* e *Vesivirus*. Destes, os norovírus e os sapovírus são reconhecidos agentes de doença entérica em mamíferos, incluindo humanos, sendo o vírus de Norwalk o mais reconhecido (Blacklow, 1996). Os vesivírus e os lagovírus são agentes causadores de doenças sistémicas em hospedeiros animais específicos, como por exemplo o vírus do Exantema Vesicular Suíno (Horak, Killoran, & Larson, 2016) e a Doença Hemorrágica Viral dos coelhos (Abrantes, van der Loo, Le Pendu, & Esteves, 2012), respetivamente. Os *Nebovirus* foram o último género a ser sugerido (Smiley, Chang, Hayes, Vinje, & Saif, 2002) e estão associados a doença entérica em gado bovino (Kaplun, Guenau, Asdrubal, Pothier, & Ambert-Balay, 2011).

Nos últimos anos 5 novos géneros foram ainda propostos para integrar esta família, designadamente: *Recovirus*, identificado num macaco rhesus (Farkas, Sestak, Wei, & Jiang, 2008); *Valovirus*, em porcos domésticos (L’Homme *et al.*, 2009); *Bavovirus*, em galinhas (Wolf, Reetz, & Otto, 2011); *Nacovirus*, em frangos de engorda (Wolf *et al.*, 2012); e *Secalivirus*, identificado em águas residuais (Ng *et al.*, 2012).

Atualmente, o género *Sapovirus* é constituído por 1 única espécie com o mesmo nome, o sapovírus, dividido em 5 genogrupos: 4 genogrupos (GI, GII, GIV e GV) que contemplam espécies de sapovírus identificadas em humanos, e um outro genogrupo (GIII) ao qual pertencem espécies de sapovírus identificadas em suínos (Farkas *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2006). Esta divisão é feita com base na análise filogenética do gene que codifica a proteína estrutural da cápside, a VP1 (L'Homme *et al.*, 2009), a região mais divergente do genoma (Farkas *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2006). Recentemente foram propostos mais 9 genogrupos (GVI a GXIV) (Scheuer *et al.*, 2013) identificados em leitões, porcos de engorda, cães e morcegos (Barry, Alfieri, & Alfieri, 2008; Nakamura *et al.*, 2010; Scheuer *et al.*, 2013), ainda que muitas destas novas classificações tenham por base apenas as sequências que codificam a polimerase viral, ao invés da VP1. Dentro de cada genogrupo podem ainda identificar-se diferentes genótipos, o que realça a elevada diversidade genética presente no género *Sapovirus* (Tse *et al.*, 2012).

Num estudo realizado em 2009, no auge da identificação de novas estirpes de calicivírus, cientistas britânicos realizaram uma avaliação de risco qualitativa para determinar o potencial risco zoonótico associado à emergência de norovírus e sapovírus (Bank-Wolf, König, & Thiel, 2010). Atendendo ao facto de que nenhuma estirpe obtida a partir de fezes humanas infetadas correspondia a sequências animais conhecidas à data, concluiu-se que apesar dessa transmissão zoonótica não poder ser excluída, caso ocorra será considerada um evento raro.

2.3 Epidemiologia

À data, os sapovírus já foram identificados em diferentes espécies animais, para além do homem. Primeiramente em leitões com 27 dias de vida, por Saif, Bohl, Theil, Cross e House (1980), inicialmente designando os sapovírus de PEC (do inglês, *porcine enteric calicivírus*); e anos mais tarde também em visons (Guo, Evermann, & Saif, 2001), cães (Li, Pesavento, *et al.*, 2011), leões-marinhos (Li, Shan, *et al.*, 2011), morcegos (Tse *et al.*, 2012) e mais recentemente em otárias sul-americanas (Kluge *et al.*, 2016).

Os sapovírus já foram descritos em mais de 35 países do mundo, incluindo nos continentes europeu (Cubitt & Mcswiggan, 1981), africano (Nakata *et al.*, 1998), asiático (Chanit *et al.*, 2009) e norte-americano (Chhabra *et al.*, 2013) sendo por isso mesmo, considerados vírus de dispersão mundial. Com relação à sazonalidade, os sapovírus são maioritariamente detetados durante a estação fria (Dey *et al.*, 2011).

O período de incubação do vírus varia entre 1 a 4 dias pós-infecção (Oka *et al.*, 2015) e a transmissão da infeção parece ter mais expressão na sua via direta (por contacto direto com fezes ou vómito com viriões) e em locais fechados (Räsänen *et al.*, 2010). Ao longo da história têm-se verificado sucessivas descrições de surtos gastroentéricos em locais como infantários, escolas, hospitais e casas de repouso (Cubitt, McSwiggan, & Arstall, 1980; Johansson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Mikula *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2005). Porém também a via indireta é

tida em consideração no ciclo de transmissão viral, na medida em que já foram descritos surtos por sapovírus cuja causa mais provável parece ter sido a contaminação de alimentos, como no caso de um surto decorrido ao largo do Golfo Pérsico, num navio Real Britânico (Gallimore *et al.*, 2004), ou até no maior surto ocorrido no Japão (n= 665), cuja fonte comum implicada no foco epidemiológico foi a distribuição de lancheiras preparadas por uma empresa de *catering* (Kobayashi *et al.*, 2012).

Também já foram detetados sapovírus de estirpes humanas em molúsculos e em amostras ambientais provenientes de águas superficiais (rio e águas residuais), sugerindo que estes vírus podem contaminar ambientes aquáticos a partir das descargas domésticas, sendo posteriormente detetados em animais bioacumuladores (Oka *et al.*, 2015; Ozawa, Kumazaki, Ueki, Morita, & Usuku, 2015; Ueki *et al.*, 2010).

Num estudo de Chhabra e colaboradores (2013), também nos EUA, e elaborado com recurso a 782 amostras fecais de crianças entre os 15 dias de vida e os 5 anos, observadas em unidades de saúde várias e diagnosticadas com GEA, conclui-se que os sapovírus humanos foram os segundos mais prevalentes agentes patogénicos entéricos (5.4%) apenas precedidos dos adenovírus (11.8%). Conclui-se ainda que existe uma elevada taxa de co-infecção associada a estes casos, tendo sido detetados adenovírus, astrovírus e sapovírus em simultâneo em 22.1% dos pacientes.

Estes dados foram similares a outros artigos que associam a ocorrência de doença em humanos a crianças mais jovens, até aos 5 anos de idade, ao invés de em crianças mais velhas ou adultos (Oka *et al.*, 2015; Rockx *et al.*, 2002).

Nas espécies animais, os estudos epidemiológicos são menos frequentes. Em porcos domésticos, o estudo mais recente decorrido na China e com uma amostragem de 203 amostras fecais identificou uma positividade a sapovírus porcino em 8.9% das amostras, ocorrendo co-infecção com o vírus da diarreia epidémica suína em 8.4% e co-infecção múltipla em 7.4% dos animais (Wang, Lan, & Yang, 2016). Ao contrário dos norovírus em que as infeções estão sobretudo associadas a porcos em acabamento, as infeções por sapovírus parecem ocorrer em todas as idades (Chao, Wei, Chang, Wang, & Wang, 2012; Wang, Souza, Funk, Zhang, & Saif, 2006).

Em animais de companhia os dados científicos existentes são insuficientes, mas sugere-se que infeções por norovírus e sapovírus possam ser mais frequentes em gatinhos e cachorros de raças puras e que a infeção tenha mais tendência para ocorrer em locais fechados e com maior contacto entre indivíduos, como em criadores e em lojas de animais (Soma, Nakagomi, Nakagomi, & Mochizuki, 2015).

Com relação à sua estabilidade fora do hospedeiro, os calicivírus aparentam ser bastante estáveis no meio ambiente e a maioria dos vírus desta família é resistente à inativação pelo calor e a determinados agentes químicos. Segundo Wang, Zhang, e Saif (2012) os sapovírus são sensíveis ao tratamento com etanol a 60-70% a temperatura ambiente durante 30

segundos, são inativados em 200mg/L de hipoclorito de sódio a temperatura ambiente durante 30 minutos, e inativados pelo calor, a 56°C durante 2 horas. São estáveis em pH ácido (até pH 3), a temperatura ambiente durante 1 hora.

2.4 Patogénese

A principal sintomatologia inclui vômito e diarreia, em 89.4% e 63.1% respetivamente, dos doentes em que o sapovírus foi o único agente responsável por casos de GEA (Chhabra *et al.*, 2013). Também outros sinais podem surgir associados a este vírus e ser relativamente frequentes, tais como náusea, dores abdominais, calafrios, cefaleia, mialgias ou mal-estar geral. Normalmente, os sintomas são autolimitantes e os pacientes recuperam dentro de poucos dias (Oka *et al.*, 2015).

A gravidade das gastroenterites por sapovírus é inferior à causada por rotavírus ou norovírus (Rockx *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2001). Ainda que a sintomatologia, gravidade e duração da doença sejam dependentes do indivíduo, os norovírus humanos estão mais frequentemente associados a situações clínicas mais complicadas e em grupos de risco, como prematuros e pacientes imunocomprometidos (Bok & Green, 2012; Naing *et al.*, 2013) sendo que tal informação não se encontra disponível com relação aos sapovírus humanos.

As infeções subclínicas também já foram relatadas (Chhabra *et al.*, 2013; Matson, Estes, Tanaka, Bartlett, & Pickering, 1990) e sabe-se inclusivamente que indivíduos assintomáticos podem excretar o vírus nas fezes a níveis comparáveis aos excretados por indivíduos com infeções clínicas (Yoshida *et al.*, 2009). A excreção de sapovírus pode continuar depois do desaparecimento dos sintomas, ainda que decresça para níveis quase indetetáveis às 2 semanas pós-infeção (Hansman, Saito, *et al.*, 2007).

A resposta serológica à infeção por sapovírus foi demonstrada por microscopia eletrónica e por ELISA (Cubitt & McSwiggan, 1987; Nakata, Estes, & Chiba, 1988), ocorrendo um aumento gradual da seroprevalência com a idade, atingindo-se um nível muito elevado (>90%) em idade escolar, e permanecendo este elevado (80-100%) em adultos (Farkas, Deng, Ruiz-Palacios, Morrow, & Jiang, 2006; Nakata *et al.*, 1998), provando assim que a infeção por sapovírus é comum durante a infância. Os mecanismos imunitários de proteção contra infeções por sapovírus ao nível do local primário da infeção continuam, contudo, por esclarecer.

Em cães poucos estudos foram ainda elaborados e os positivos são sistematicamente associados a infeções mistas, pelo que os dados epidemiológicos existentes não são suficientes para determinar um potencial patogénico dos sapovírus ou dos norovírus nesta espécie (Soma *et al.*, 2015).

Em vison, os sapovírus foram responsáveis por surtos de diarreia em explorações nos EUA, sendo que o aparecimento de sintomatologia clínica iniciou-se primeiramente com animais mais velhos e só numa fase posterior em animais mais jovens (Guo *et al.*, 2001). A

alimentação dos visons com vísceras de suínos foi discutida como a principal fonte de infecção, ainda que tais observações não tenham sido satisfatoriamente confirmadas (Bank-Wolf *et al.*, 2010).

No estudo de Li, Shan, e colaboradores (2011) foram detetadas com abundância, por metagenômica, sequências que emparelharam com o gênero *Sapovírus* num único leão-marinho californiano, que apresentava um quadro clínico compatível com osteomielite grave e nefrolitíase, sem que contudo se pudesse estabelecer qualquer relação entre estes dois acontecimentos. Esses *novel* vírus foram designados por CslSaV1 e CslSaV2 (do inglês, *california sea lion sapovirus*). Também no estudo por metagenômica de Kluge e colaboradores (2016) se detetaram sequências aminoácidas com 98% de identidade com o vírus CslSaV1, mas neste caso em otárias sul-americanas, uma outra espécie de pinípedes, sem qualquer associação a sintomatologia clínica.

A partir de estudos experimentais em leitões gnobióticos infetados com a estirpe Cowden, pôde observar-se alterações histológicas como atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais (Saif *et al.*, 1980), sendo estas as únicas descrições à data acerca das formas lesionais decorrentes de uma infecção por sapovírus.

2.5 Organização Molecular e Genômica

Os viriões dos sapovírus não possuem invólucro lipídico, e têm uma simetria icosaédrica composta por 180 protômeros, como representado esquematicamente na Figura 9.

A dimensão dos viriões varia de 30-38nm de diâmetro com uma arquitetura da cápside típica, com 32 depressões bem destacadas em forma de taça em cada um dos eixos da estrutura icosaédrica, sendo por vezes relacionadas com a forma de uma “estrela de David” (Clarke, Knowles, Studdert, & Vinjé, 2012; Madeley, 1979) (Figura 10).

Figura 9. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de sapovírus.
Adaptado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/196.html

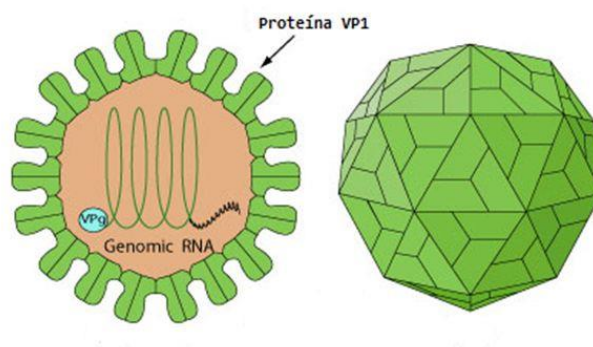
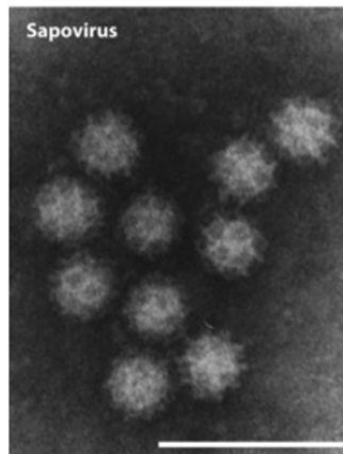


Figura 10. Fotografias de microscopia eletrônica de sapovírus a partir de amostras fecais humanas. A barra branca no canto inferior direito corresponde a 100 nm. Na imagem: em cada uma das partículas virais observam-se os halos escuros centrais, que correspondem às depressões presentes na cápside. Fonte: Oka *et al.*, 2015.



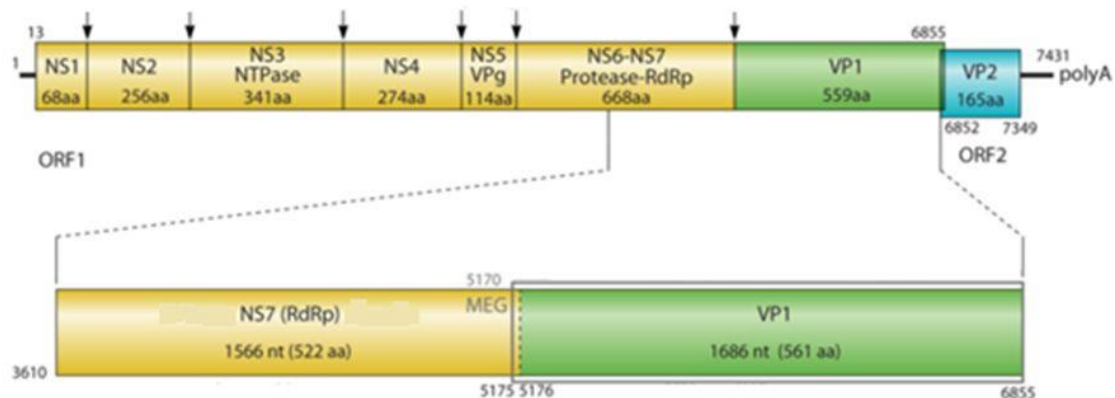
O genoma dos sapovírus, segundo a classificação de Baltimore (1971), pertence ao grupo IV, uma molécula ssRNA(+) com 7.3 a 8.3 kb. A extremidade 5' está unida por uma ligação covalente a uma proteína VPg (do inglês, *viral protein genome-linked*), que é fundamental à replicação do genoma viral, transcrição e tradução; e a extremidade 3' termina com uma cauda de poliadenosinas [poly (A)] (Thiel & König, 1999).

O RNA genômico de sentido positivo é utilizado como RNAm após entrada na célula hospedeira, permitindo a tradução direta das proteínas precoces.

Como representado na Figura 11, o genoma dos sapovírus contém duas ORFs: a ORF1 que codifica uma poliproteína que contém as proteínas não-estruturais, e ainda a proteína da cápside, a VP1; e a ORF2 que codifica uma proteína estrutural menor, a VP2. Uma terceira ORF (ORF3) já foi referenciada em algumas estirpes humanas (Liu, Clarke, Caul, & Lambden, 1995; Okada *et al.*, 2006) sem que contudo se conheça a sua função. A ORF1 codifica pelo menos 6 proteínas não estruturais conhecidas (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 e NS6-NS7) e uma proteína estrutural (VP1) posteriormente hidrolisadas por proteases virais (Oka *et al.*, 2005; Yokoyama, Oka, *et al.*, 2012). A proteína NS6-NS7 possui um domínio de proteases e a polimerase viral, a RdRp (Oka, Murakami, Wakita, & Katayama, 2011).

O conhecimento básico sobre os locais de infecção/replicação, alterações lesionais e tipo de resposta imunológica, continuam por esclarecer. O mecanismo específico de adesão do vírus aos recetores membranares, a entrada nas células alvo, a replicação do RNA e a sua tradução não estão definidos, parcialmente devido à ausência de culturas celulares (Oka *et al.*, 2015).

Figura 11. Diagrama representativo da organização genómica dos sapovírus. Na figura pode observar-se: as duas grelhas de leitura (ORF 1 e ORF2), as proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 e NS6-NS7 [protease-RdRp]) e as proteínas estruturais VP1 e VP2. Os locais sugeridos como os pontos de clivagem estão indicados com setas. Adaptado de Oka *et al.*, 2015.



2.6 Diagnóstico

A sintomatologia observada aquando das infeções por sapovírus é indistinguível das de gastroenterites provocadas por outros vírus entéricos, e como tal o diagnóstico laboratorial torna-se imperativo para identificação do agente patogénico envolvido. A partir de microscopia eletrónica, os sapovírus são morfologicamente distinguíveis (Roingeard, 2008), contudo este método apresenta uma menor sensibilidade quando comparada com o método de deteção de ácidos nucleicos (Pang, Preiksaitis, & Lee, 2014).

A deteção de antígenos a sapovírus humanos através de ELISA tem sido uma técnica utilizada na prática clínica a partir de amostras biológicas (Hansman *et al.*, 2006; Matson *et al.*, 1990; Nakata *et al.*, 1998). Porém, esta pode tornar-se de fraca fiabilidade se se tiver em consideração a quantidade de estirpes de sapovírus antigenicamente diferentes (Hansman, Oka, *et al.*, 2007; Hansman *et al.*, 2006).

Assim sendo, a deteção de ácidos nucleicos a partir de RT-PCR, e especialmente a partir de *real-time* RT-PCR tornou-se o principal método de rotina para deteção de sapovírus a partir de amostras biológicas (Iwakiri *et al.*, 2009).

Também as mais recentes técnicas de RT-PCR *multiplex* ou a utilização da tecnologia Luminex (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) já foram relatados para deteção de sapovírus humano em conjunto com outros vírus responsáveis por casos de gastroenterite. No entanto, e uma vez que estes testes foram concebidos para deteção simultânea de múltiplos vírus, desconhece-se a capacidade dos mesmos em detetar todos os genótipos de sapovírus. Como mencionado anteriormente, nos últimos anos a metagenómica tem também permitido a identificação de novas estirpes de sapovírus a partir de amostras biológicas e ambientais, no entanto estas abordagens acabam por não ser comumente utilizadas devido aos custos

inerentes e à, para já, incompleta análise dos dados, quando em comparação com os métodos tradicionais (Oka *et al.*, 2015).

Com relação ao isolamento deste vírus, é de salientar que apesar de algumas tentativas de crescimento de sapovírus humanos já terem sido reportadas (Cubitt & Barrett, 1984) não existem dados quanto à reprodutibilidade desses métodos, pelo que à data de hoje se considera que nenhum dos sapovírus humano é passível de ser isolado em culturas celulares (Clarke *et al.*, 2012). Apenas a estirpe Cowden de um sapovírus porcino, o PEC, foi suscetível ao crescimento em linhas celulares LLC-PK1 (do inglês, *Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney*) na presença de conteúdo intestinal e de ácidos biliares (Chang *et al.*, 2004; Parwani, Flynn, Gadfield, & Saif, 1991), sendo este o único modelo *in vitro* existente.

3. Bocavírus

3.1 Introdução

O género *Bocaparvovirus*, anteriormente apenas designado de *Bocavírus*, é um dos 8 géneros da subfamília *Parvovirinae*, pertencente à família *Parvoviridae*. É constituído por um genoma de ácido desoxirribonucleico de cadeia simples (ssDNA) e desde há uma década atrás que o conhecimento acerca destas entidades se tem vindo a expandir.

Os bocavírus são considerados vírus únicos entre os parvovírus, pois contêm uma terceira ORF entre as regiões codificantes das proteínas não-estruturais e das proteínas estruturais (Kapoor *et al.*, 2011; Qiu, Cheng, Johnson, & Pintel, 2007).

Atualmente sabe-se que os bocavírus infetam normalmente o trato respiratório e o trato gastrointestinal de crianças e adultos, bem como de variados outros mamíferos, terrestres e aquáticos.

O primeiro bocavírus identificado foi o denominado parvovírus bovino em 1961 (Abinanti & Warfield, 1961), seguido do *minute virus of canines* em 1967 (Binn, Lazar, Eddy, & Kajima, 1970). Mas apenas em 2003 e 2004, respetivamente, estes vírus passaram a integrar o à altura denominado género *Bocavirus*, cujo nome derivou precisamente dos primeiros dois hospedeiros que constituíam as duas únicas espécies, do inglês, *bovine-canine virus* (Tattersall, 2003).

3.2 Taxonomia, Evolução e Emergência

Os vírus da família *Parvoviridae* infetam um amplo número de hospedeiros, e em consequência disso mesmo surge a divisão em 2 subfamílias: a *Parvovirinae*, que alberga vírus cujos hospedeiros são animais vertebrados, e a *Densovirinae*, que infeta hospedeiros artrópodes.

Em 2013 foi redigida uma proposta de revisão acerca da taxonomia desta família. Dessa revisão resultou que em alternativa ao isolamento viral, os vírus sequenciados que emparelhassem com as regiões codificantes de todas as proteínas estruturais e não-estruturais, pudessem ser admitidos para classificação dentro desta família (Cotmore *et al.*, 2014). Deste modo, resultaram inúmeras alterações, como a eliminação, criação e/ou a reclassificação de alguns géneros. Presentemente o ICTV reconhece 8 géneros diferentes dentro da subfamília *Parvovirinae*. São eles os géneros: *Aveparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus* e *Tetraparvovirus* (ICTV, 2015). O género *Bocaparvovirus* alberga 12 espécies virais reconhecidas, divididas em 4 genogrupos, nomeadamente: *Carnivore bocaparvovirus 1-3*, *Pinniped bocaparvovirus 1 e 2*, *Primate bocaparvovirus 1 e 2* e *Ungulate bocaparvovirus 1-5*. Nos últimos anos muitos *novel* bocavírus animais foram identificados e geneticamente caracterizados (Blomström *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014; Kapoor *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2012). Em 2011 os bocavírus porcos foram classificados segundo o critério de que estirpes dentro da mesma espécie partilham uma homologia de pelo menos 95% no gene não-estrutural NS1 (Zeng *et al.*, 2011). Porém em 2012, foi apresentado um outro método de classificação baseado na proteína estrutural VP1 e posteriormente proposto por outros autores (Yang *et al.*, 2012; Zhou, Sun, & Wang, 2014). Nesse novo cenário, as estirpes com uma divergência nucleotídica superior a 40% seriam consideradas vírus pertencentes a diferentes grupos, e aquelas com uma divergência superior a 10% entre si, seriam divididas em subgrupos.

Para além dos suínos, outros *novel* bocavírus como os de gorila, foram identificados em amostras fecais da espécie *Gorilla gorilla*, provenientes de uma coleção zoológica nos EUA, e colhidas durante um surto de gastroenterite aguda em 2009 (Kapoor, Mehta, *et al.*, 2010). De forma semelhante, foram identificadas sequências de bocavírus em amostras fecais de chimpanzés nos Camarões, em África (Sharp *et al.*, 2010).

Também em leões-marinhos californianos, 4 novos bocavírus foram identificados no seu bioma fecal, a partir de técnicas de sequenciação por metagenómica (Li, Shan, *et al.*, 2011). O bocavírus humano foi primeiramente detetado em zaragatoas orofaríngeas de crianças com infeções do trato respiratório inferior na Suécia (Allander *et al.*, 2005), e posteriormente descritos novos tipos (2, 3 e 4) em amostras fecais no Paquistão (Kapoor, Slikas, *et al.*, 2009), Austrália (Arthur, Higgins, Davidson, Givney, & Ratcliff, 2009) e na Tunísia e Nigéria (Kapoor, Simmonds, *et al.*, 2010).

No ano de 2012, quer Kapoor e colaboradores, quer Lau e colaboradores identificaram uma nova espécie de bocavírus canino (tipo 2), a partir de amostras fecais e/ou respiratórias de cães saudáveis e/ou com sintomatologia respiratória, e no ano seguinte uma terceira espécie, o bocavírus canino tipo 3 foi identificado num macerado de fígado de um cão co-infetado com um novo circovírus (Li *et al.*, 2013).

Ainda em 2012, num estudo que contou com uma amostra de 364 gatos, identificou-se e caracterizou-se geneticamente um *novel* bocavírus, o bocavírus felino (Lau *et al.*, 2012). Neste mesmo artigo, sugere-se que os bocavírus canino e felino partilhem um ancestral comum, na medida em que partilham biótopos semelhantes, ainda que se admita que a transmissão inter-espécies seja pouco provável de ter ocorrido num passado recente. Desde que a infeção foi confirmada em Hong Kong (Lau *et al.*, 2012), a infeção por bocavírus felino já foi posteriormente reportada em Portugal (Ng *et al.*, 2014) e nos EUA (Zhang *et al.*, 2014), existindo assim 3 genótipos distintos para a espécie.

Em 2014, Jiang e colaboradores, a partir da tecnologia *PCR* multiplex identificaram 6 novas espécies e 12 novas estirpes de bocavírus em porcos, num total de 365 amostras, tendo sido a co-infeção de uma mesma amostra por múltiplas estirpes deste vírus considerada um evento frequente.

Por fim, em Maio do presente ano, Yang e colaboradores (2016) identificaram um *novel* bocavírus em fezes de visons na China, que foi provisoriamente apelidado de *mink bocavírus*. Todos estes novos bocavírus propostos, foram identificados predominantemente a partir de amostras fecais e/ou em amostras respiratórias, quer de hospedeiros saudáveis, quer de hospedeiros com algum tipo de sintomatologia, ainda que em casos mais raros tenham também sido detetados vírus em soros ou em amostras tecidulares várias (Cotmore *et al.*, 2014).

De referir ainda que os parvovírus são considerados por vários autores, vírus com taxas de mutação próximas das evidenciadas nos vírus RNA (Hoelzer, Shackelton, Parrish, & Holmes, 2008; Shackelton, Parrish, Truyen, & Holmes, 2005) e que apesar de terem a necessidade de recorrer à maquinaria celular para que a replicação se processe, sugere-se que possam sofrer rápidas evoluções, gerando novos genótipos e/ou espécies geneticamente divergentes (Duffy, Shackelton, & Holmes, 2008).

3.3 Epidemiologia

Como referido anteriormente, atualmente conhecem-se 8 espécies hospedeiras dos bocavírus, para além do homem (Allander *et al.*, 2005), nomeadamente: bovino (Abinanti & Warfield, 1961), cão (Decaro *et al.*, 2012; Pratelli & Moschidou, 2012); gorila (Kapoor, Mehta, *et al.*, 2010), chimpanzé (Shan *et al.*, 2010), leão-marinho californiano (Li, Shan, *et al.*, 2011), porco (Li *et al.*, 2012), gato (Lau *et al.*, 2012; Pesavento & Murphy, 2014) e vison (Yang *et al.*, 2016).

A via de transmissão dos bocavírus humanos é ainda desconhecida, contudo sabe-se que muitos parvovírus são transmitidos por inalação ou por contacto direto ou indireto com expetoração, fezes ou urina, pelo que se pensa que os bocavírus possam ser transmitidos de forma similar (Jartti *et al.*, 2012).

No homem, o bocavírus humano tipo 1 (Allander *et al.*, 2005) foi associado a doença respiratória aguda com taxas de incidência entre 1,5% e 11,3% em todo o mundo (Qiu *et al.*, 2007). A serologia indica que este vírus está presente em mais de 90% da população humana, e que o contacto com o mesmo ocorre numa fase prematura da infância. O bocavírus humano tipo 2 é considerado o bocavírus humano entérico mais comum (Kapoor *et al.*, 2011), sendo que juntamente com o bocavírus humano tipo 3 surgem mais frequentemente associados a episódios de gastroenterite (Arthur *et al.*, 2009). Os bocavírus são ainda passíveis de ser detetados, menos frequentemente, no soro, LCR (líquido cefalorraquidiano) e linfonodos (Norja *et al.*, 2012).

Sabe-se também que co-infecções por outros vírus gastrointestinais são relativamente comuns (Jartti *et al.*, 2012), com taxas de 83 e 100% para amostras respiratórias ou fecais, respetivamente. Pensa-se que estes valores elevados, juntamente com o facto de se detetarem frequentemente excretores assintomáticos, se possa dever ao longo período de excreção do vírus após infeção (Martin *et al.*, 2010) detetado inclusivamente durante 4,5 meses em crianças imunodeprimidas (Blessing, Neske, Herre, Kreth, & Weissbrich, 2009). Desconhece-se no entanto se uma primoinfeção por este vírus providencia algum tipo de proteção contra reinfeções subsequentes com o mesmo ou com diferentes genótipos ou espécies (Kapoor *et al.*, 2011).

Uma grande parte das publicações científicas recentes sobre bocavírus tem incidido em suínos domésticos (porcos em acabamento, porcas reprodutoras e leitões), pelo que o vírus já foi identificado em diferentes amostras biológicas, designadamente: linfonodos (Blomström *et al.*, 2009), soro (Sun *et al.*, 2009), macerado intestinal (McKillen *et al.*, 2011), pulmão (Jiang *et al.*, 2014), saliva (Choi, Park, *et al.*, 2014) e baço (Liu *et al.*, 2014). Mesmo assim, as amostras nasofaríngeas ou as amostras fecais são tipicamente mais usadas para deteção viral, muito devido à maior acessibilidade das mesmas e elevada percentagem de deteção (Lau *et al.*, 2011).

A prevalência da infeção por bocavírus porcino é variável com a idade, sendo que um estudo de 2010 refere que a infeção foi significativamente mais prevalente em leitões desmamados (69.7%) que em leitões não desmamados (13.6%), porcos adultos (0%), porcas adultas (7.7%) ou fetos abortados (0%) (Zhai *et al.*, 2010). A baixa prevalência da infeção deste vírus em leitões com menos de 6 meses permitiu aos autores inferir o papel fundamental da passagem de imunidade passiva. Também num estudo de 2014 nos EUA, as taxas de deteção de bocavírus em porcos foram elevadas, de 21.3 a 50.8% em amostras de pulmão, linfonodos, soro e fezes (Jiang *et al.*, 2014).

Em animais de companhia, verificam-se ainda poucos estudos epidemiológicos. O mais recente artigo de Guo e colaboradores (2016) e Lau e colaboradores (2012) reportam positividade a bocavírus canino em 7.5% e 4.6% das amostras respiratórias, respetivamente, sem que contudo se conseguisse estabelecer associação estatística entre animais saudáveis

ou animais com diarreia e a excreção viral. Os genomas virais foram identificados predominantemente em amostras respiratórias (Kapoor *et al.*, 2012). Ainda assim, o elevado nível de co-infecção presente em amostras fecais, sugere que o bocavírus canino possa ter, em conjunto com outros agentes entéricos, um papel importante na diarreia viral em cães (Guo *et al.*, 2016).

O bocavírus felino já foi identificado por PCR em 7.2%, 0.3%, 1.6%, 2.0% e 0.8% de amostras fecais, nasais, urina, rim e sangue, respetivamente (Lau *et al.*, 2012), e este ano, em Abril, um estudo epidemiológico decorrido no Japão detetou uma taxa de infeção de 9.9% (de um total de 101 animais) a partir de zaragatoas rectais; e num estudo decorrido em Viseu, Portugal, detetou-se a presença do vírus em 6% das 55 amostras fecais testadas (Ng *et al.*, 2014).

Em leões-marinheiros californianos, no estudo de Li, Shan, e colaboradores (2011) os bocavírus foram os segundos agentes entéricos mais prevalentes, sendo que 38% dos animais se apresentava a excretar o vírus, sem que no entanto o seu poder patogénico tenha sido esclarecido.

O bocavírus de gorila, identificado quase em simultâneo por dois grupos de trabalho, foi considerado comum, num estudo seroepidemiológico, entre chimpanzés (73%) e gorilas (36%) (Sharp *et al.*, 2010).

3.4 Patogénese

Em humanos, as infeções por bocavírus tanto podem estar associadas a casos com sintomatologia gastrointestinal como respiratória, sendo que a patogénese dos bocavírus não é ainda totalmente conhecida (Jartti *et al.*, 2012). As publicações com descrições de casos são várias, e com resultados pouco consistentes. As conclusões mais típicas apontam para associações mais fortes com sintomatologia respiratória, como infeção do trato respiratório inferior em crianças, principalmente quando em associação com outros agentes virais (Bastien, Brandt, Dust, Ward, & Li, 2006; Chen *et al.*, 1986; McIntosh, 2006; Sloots, Whiley, Lambert, & Nissen, 2008) e associações mais fracas a sintomatologia entérica (Lee, Chung, Han, Song, & Hwang, 2007; Kapoor *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2008). Tais dados levam alguns autores a referir que o bocavírus humano é primariamente, ainda que não exclusivamente, um vírus respiratório (Lee *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008).

Têm-se descrito uma grande variedade de sintomas associados à deteção do vírus, incluindo: rinite, faringite, tosse, dispneia, pneumonia, otite média aguda, febre, náusea, vômito e diarreia (Allander *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2009; Finianos *et al.*, 2016; Kapoor, Slikas, *et al.*, 2009). Muitas destas potenciais manifestações, não têm todavia, sido exploradas de uma forma sistemática, pelo que se questiona qual o real poder patogénico dos bocavírus, tendo em conta as elevadas taxas de co-infecção e ainda as elevadas taxas de deteção em pacientes assintomáticos (Jartti *et al.*, 2012).

Também o mecanismo de infecção dos bocavírus porcos continua pouco esclarecido. Apesar destes vírus serem mais prevalentes nas fezes, a sua presença noutros tecidos como linfonodos, soro e zaragatoas nasofaríngeas, sugerem um tropismo tecidual mais alargado do que o inicialmente conhecido (Lau *et al.*, 2011). Este vírus já foi associado a diarreia em leitões (Zhang *et al.*, 2013), mas também identificado em porcos saudáveis (Blomström *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2011; McKillen *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2010). A conclusão que surge de forma mais coerente entre estudos parece ser a importância das co-infecções. Zhang e Zhou e colaboradores (2013; 2014) descrevem quadros diarreicos muito graves associados a elevadas taxas de co-infecção, sugerindo por isso mesmo medidas profiláticas, como a vacinação, para o controlo mais eficaz dos efetivos.

O primeiro bocavírus conhecido, o parvovírus bovino, é um reconhecido agente de diarreia e pode dar origem a sintomatologia respiratória moderada em bovinos (Spahn, Mohanty, & Hetrick, 1966; Storz, Leary, Carlson, & Bates, 1978).

Inicialmente isolado de cães saudáveis numa cultura celular em 1970, o vírus *minute canine* foi posteriormente considerado um agente patogénico respiratório neonatal em cachorros recém-nascidos e capaz de causar morte fetal (Binn *et al.*, 1970), apesar das infeções por este vírus terem uma apresentação maioritariamente subclínica em adultos (Carmichael, Schlafer, & Hashimoto, 1991). Os mais recentemente detetados bocavírus caninos 1 e 2, avaliados a partir de amostras fecais, respiratórias e outras, em cães com sintomatologia respiratória (dispneia) e gastrointestinal (diarreia e vômito) também não parecem ser significativamente associados a quadros de doença (Kapoor *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2012). Apenas em 2014, no estudo de Bodewes e colaboradores se detetou uma nova estirpe de bocavírus canino tipo 2 com efetiva associação a doença, comprovada posteriormente por hibridação *in situ*. Após despiste de outros agentes normalmente associados a enterites virais e bacterianas em cachorros, confirmou-se que o bocavírus canino foi o responsável por quadros de enterite mortais em cachorros (Bodewes *et al.*, 2014). Para além da presença no trato intestinal, o vírus foi também encontrado em linfonodos.

Com relação ao bocavírus felino também não se consegue estabelecer associação entre a presença do vírus nas fezes e os sintomas gastrointestinais (Takano, Takadate, Doki, & Hohdatsu, 2016).

Apesar da patogenicidade do bocavírus felino e do bocavírus canino permanecer, também, ainda por determinar, mais uma vez a sua presença em diferentes tecidos sugere um tropismo celular diversificado (Lau *et al.*, 2012).

Com relação aos animais não-domésticos, de referir que apenas o bocavírus de gorila foi detetado durante um surto de enterite aguda (Kapoor, Mehta, *et al.*, 2010), sendo que os estudos em chimpanzés e em leões-marinhos californianos não foram associados a doença (Li, Shan, *et al.*, 2011; Sharp *et al.*, 2010).

3.5 Organização Molecular e Genômica

Os parvovírus encontram-se entre os vírus sem envelope e com simetria icosaédrica mais pequenos, contudo a observação de bocavírus por microscopia eletrónica (Figura 12) apenas aconteceu em 2007 a partir de aspirados nasofaríngeos confirmados positivos a bocavírus humano por PCR (Brieu, Gay, Segondy, & Foulongne, 2007). Nessa observação constatou-se que as partículas virais possuíam um diâmetro de 25nm e uma estrutura da cápside hexagonal. Através de microscopia crioelétrica pôde observar-se a estrutura tridimensional do vírus, cuja cápside possui 12 pentâmeros num total de 60 protómeros (Gurda *et al.*, 2010), como esquematicamente representado na Figura 13.

Figura 12. Imagem de microscopia eletrónica de fase negativa de um bocavírus humano. Adaptado de Gurda *et al.*, 2010.

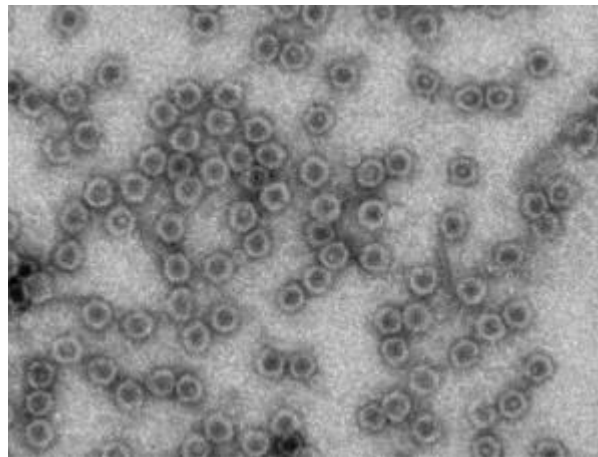
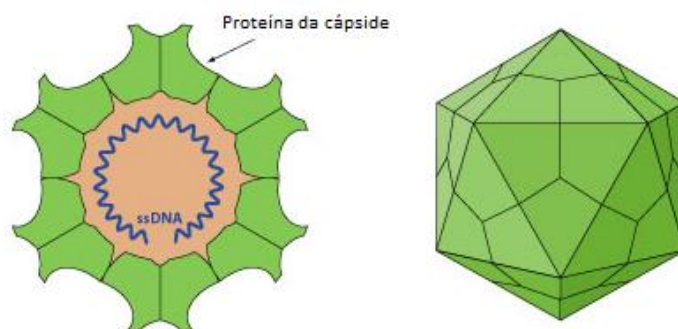


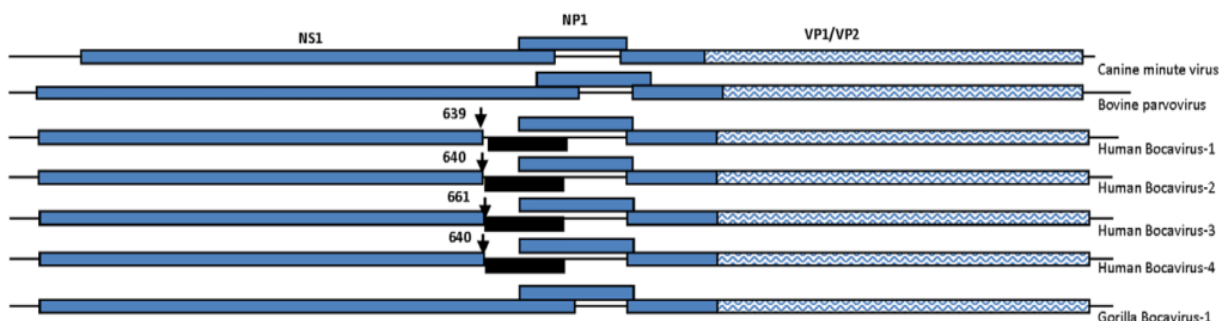
Figura 13. Ilustração da estrutura molecular dos viriões de bocavírus. Adaptado de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/567.html



Os bocavírus são vírus de genoma ssDNA, pertencentes ao grupo II da classificação de Baltimore (1971), com 5.5kb e que para além de apresentarem os 2 genes típicos da família *Parvoviridae*, apresentam ainda uma 3ª ORF, única deste género (Allander, 2008; Chen *et al.*, 1986). Assim de forma sequencial, o genoma dos bocavírus apresenta: a ORF1 que codifica a proteína não-estrutural NS1, que por sua vez codifica proteínas enzimáticas extremamente conservadas e essenciais à replicação viral; a ORF3 que codifica a proteína NP1 de função ainda desconhecida; e a ORF2 que codifica as proteínas da cápside, VP1 e VP2, que por clivagens subsequentes dão origem a proteínas estruturais (Cotmore *et al.*, 2013; Kapoor *et al.*, 2012).

No caso específico da organização genómica dos bocavírus humanos encontra-se ainda uma outra particularidade: a ORF que codifica a proteína NS1 codifica também uma proteína mais curta, denominada por NS2, sendo este domínio observado para os 4 tipos de bocavírus humano (Kapoor *et al.*, 2011) (Figura 14).

Figura 14. Organização genómica dos bocavírus.
Adaptado de Kapoor, Mehta, *et al.*, 2010.



Após ligação do virião aos recetores da membrana citoplasmática, a entrada dos vírus por endocitose é mediada pela clatrina (Dudleenamjil *et al.*, 2010). O virião penetra no citoplasma através de um mecanismo de permeabilidade da membrana endossómica da célula hospedeira e ocorre o transporte microtubular do genoma ssDNA para o núcleo – o local de replicação. Uma vez aí, ocorre a replicação da cadeia simples para uma cadeia dupla, a dsDNA, através de uma DdDp (DNA polimerase dependente de DNA) da célula hospedeira (Murray *et al.*, 2009). A partir da transcrição desse dsDNA origina-se o RNAm a partir do qual se processa a tradução das proteínas virias. As novas moléculas de ssDNA formadas podem ser convertidas em novas moléculas de dsDNA e servir de *template* para nova transcrição/replicação ou ser encapsidadas e ser libertadas sob a forma de viriões por lise celular.

3.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de eleição para detecção de bocavírus humano é a realização de uma PCR a partir do soro. Caso não seja exequível, pode realizar-se uma PCR quantitativa com um *cutoff* $>10^4$ cópias de genoma/mL de aspirado nasal. Segundo Jarthi e colaboradores (2012) o diagnóstico não deve ser baseado na PCR qualitativa quando se analisam amostras gastrointestinais ou respiratórias devido à prolongada positividade encontrada nas populações humanas, conduzindo a elevadas taxas de detecção em pacientes assintomáticos. Nas espécies animais a maioria dos trabalhos tem obtido resultados a partir da amplificação de sequências específicas por PCR convencional, ainda que estejam descritas técnicas como sequenciação por metagenómica (Li, Shan, *et al.*, 2011) com resultados satisfatórios.

De referir ainda que o estudo dos bocavírus ganhou maior expressão aquando da descoberta de novos bocavírus humanos no início da década, e que a maioria das novas estirpes virais têm sido classificadas e avaliadas através de técnicas de sequenciação dos seus genomas, e não por isolamento viral em culturas celulares (Chen & Qiu, 2010; Sun *et al.*, 2009). Em 2011 e mais recentemente, em 2016 foi possível o desenvolvimento de competências laboratoriais que resultaram no crescimento de bocavírus porcino em células renais de porco (McKillen *et al.*, 2011), e de bocavírus humano em células embrionárias renais humanas (Liu *et al.*, 2016).

IV. DETEÇÃO DE VÍRUS DE EXCREÇÃO FECAL EM PINÍPEDES DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

Como referido, o presente trabalho laboratorial teve por base o artigo científico de Li, Shan, *et al.* (2011) “*The Fecal Viral Flora of California Sea Lions*”. Segundo este, os resultados obtidos a partir da análise de 47 amostras fecais revelaram um grande número de leituras correspondentes a sequências virais, sendo que os bocavírus foram os vírus mais abundantes, representando 39% do total das sequências virais, seguidos dos astrovírus, que representaram 30% desse mesmo total. Os vírus mais prevalentes foram, por ordem decrescente, os astrovírus, bocavírus e rotavírus, detetados em 51% (24/47), 38% (18/47) e 28% (13/47) dos animais testados.

Tendo como base estes dados, e tendo em conta as restrições temporais e financeiras, escolheram-se inicialmente estes três grupos virais, para rastreio nas coleções de pinípedes em estudo. Contudo, não foi possível o desenho de *primers* para rotavírus, pois a dimensão das sequências disponibilizadas revelou ser demasiado pequena para a realização da análise bioinformática.

Deste constrangimento inicial resultou que, em alternativa aos rotavírus, se optasse pelo alinhamento das 2 sequências nucleotídicas quase completas dos sapovírus publicadas também por Li, Shan, *et al.* (2011) e identificadas como os terceiros vírus mais prevalentes no grupo de leões-marinhos californianos em reabilitação, o grupo mais similar à população em estudo neste trabalho.

Importa referir, que as únicas sequências nucleotídicas correspondentes a vírus de excreção fecal publicadas e disponíveis *online*, cujos hospedeiros são pinípedes, resultam apenas dos estudos de Rivera *et al.* (2010), Li, Shan, *et al.* (2011) e Kluge *et al.* (2016), e em somente 4 espécies. Este último, veio dar ênfase às motivações que levaram à realização deste trabalho, e revelou-se ainda um excelente contributo bibliográfico na medida em que a caracterização do bioma fecal é uma temática pouco explorada, principalmente nestas espécies animais. No entanto não foi considerado no desenho experimental, uma vez que foi publicado e disponibilizado *online* numa data posterior ao planeamento do trabalho. Apesar disso, os seus resultados serão avaliados para comparação com o presente estudo.

1. Objetivos do Estudo

As motivações que conduziram à realização deste trabalho de investigação laboratorial foram as seguintes:

1. O investimento contínuo na ciência com vista à proteção das espécies selvagens e ao contínuo incremento do bem-estar das espécies sob cuidados humanos, fazem parte da missão dos parques zoológicos (European Association of Zoos and Aquaria [EAZA], 2016).
2. Os pinípedes pertencem a uma superfamília (*Pinnipedia*) de mamíferos marinhos muito comum em coleções zoológicas, estando presentes em 138 instituições zoológicas europeias e num total de 227 instituições zoológicas por todo o mundo (Species360, 2016).
3. Entre as mais frequentes doenças observadas em pinípedes sob cuidados humanos, encontram-se as alterações gastrointestinais (Bonn, 2015).
4. Dada a similaridade na apresentação clínica, o diagnóstico laboratorial é fundamental para identificação dos diferentes agentes patogénicos potencialmente presentes no bioma fecal (Barzon, Squarzon, Pacenti, & Palú, 2014).
5. As recentes técnicas de sequenciação genómica têm permitido aumentar o conhecimento acerca do viroma fecal dos pinípedes (Kluge *et al.*, 2016; Li, Shan, *et al.*, 2011; Rivera *et al.*, 2010), sendo que esta caracterização poderá auxiliar a monitorização e controlo de futuros episódios de doença (Li, Shan, *et al.*, 2011).
6. À luz dos novos conhecimentos acerca de vírus entéricos no homem e em espécies animais, é pertinente que se elaborem estudos para determinar o seu espectro de hospedeiros e efetivo poder patogénico (Vu *et al.*, 2016).

Partindo destas premissas, os principais objetivos desta dissertação foram:

- Realização de um rastreio de vírus de excreção fecal, designadamente, astrovírus, sapovírus e bocavírus na coleção zoológica de pinípedes do Zoomarine, no Algarve, e na coleção zoológica de pinípedes do Aquário Vasco da Gama, em Lisboa.
- Utilização de técnicas de biologia molecular, nomeadamente a amplificação de sequências nucleotídicas específicas dos vírus supracitados.

Objetivos secundários:

- Caracterizar os resultados obtidos às variáveis: espécie, sexo, idade, história clínica e distribuição temporal.
- Aumentar o conhecimento sobre o espectro de hospedeiros destes vírus e a sua eventual associação a doença.
- Promover a realização de estudos epidemiológicos sobre agentes virais em instalações zoológicas.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da população em estudo

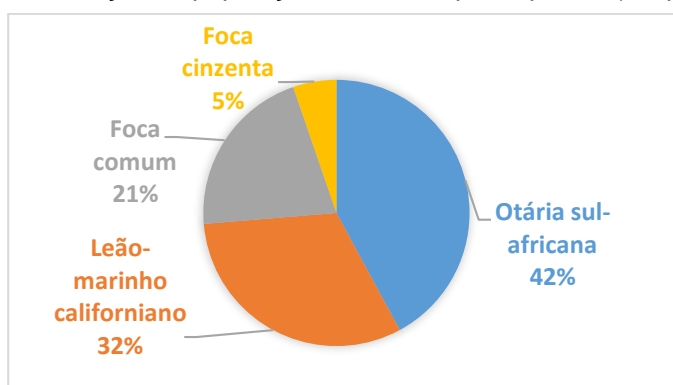
A população em estudo foi proveniente de duas coleções zoológicas:

- 18 indivíduos da coleção de pinípedes do Zoomarine, na Guia, concelho de Albufeira;
- 1 indivíduo residente nas instalações do Aquário Vasco da Gama, em Lisboa.

No total a população em estudo foi constituída por 19 indivíduos ($n=19$), de 1 subespécie e 3 espécies diferentes (Figura 15), designadamente:

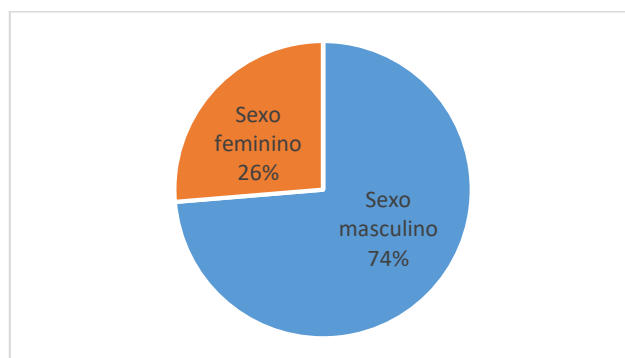
- 8 otárias sul-africanas (subespécie *Arctocephalus pusillus pusillus*)
- 6 leões-marinhos californianos (espécie *Zalophus californianus*)
- 4 focas comuns (espécie *Phoca vitulina*)
- 1 foca cinzenta (espécie *Halichoerus grypus*)

Figura 15. Distribuição da população em estudo por espécies (em percentagem).



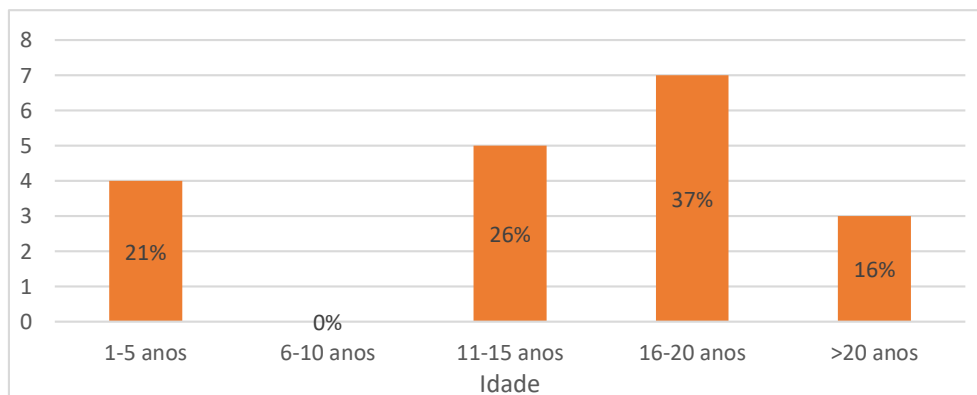
Com relação à distribuição da população por género: 14 pinípedes eram do sexo masculino e 5 pinípedes do sexo feminino (Figura 16).

Figura 16. Distribuição da população em estudo por género (em percentagem).



A média de idades da população em estudo foi de 15 anos, não se observando uma distribuição etária homogénea. Como esquematicamente representado na Figura 17, 4 animais situavam-se na faixa etária entre 1 e 5 anos, 5 animais na faixa etária entre os 11 e os 15 anos, 7 animais na faixa etária dos 16 aos 20 anos e 3 animais com mais de 20 anos de idade.

Figura 17. Distribuição da população-alvo por faixas etárias (em percentagem).



Alguns dos animais em estudo da coleção do Zoomarine eram provenientes de outras instituições zoológicas, pelo que à data das colheitas se encontravam em zona de quarentena. Em nenhum destes animais foi observada sintomatologia clínica de qualquer tipo, tendo posteriormente sido integrados na coleção residente.

Os restantes pinípedes deste mesmo parque encontravam-se distribuídos entre duas áreas animais distintas, sendo que poderia haver troca de animais entre as instalações, e portanto, os grupos não foram considerados estanques. Cada área é composta por instalações com duas ou mais piscinas e respetivas áreas secas, qualquer uma delas ao ar livre (Figura 18).

Figura 18. Otária sul-africana numa instalação do Zoomarine.
Na imagem observa-se uma piscina exterior e respetiva área seca, com acesso a sombra.
Fotografia original.



A água das piscinas é proveniente de uma captação particular à qual é adicionado cloreto de sódio e desinfetantes, sendo posteriormente filtrada em filtros de areia. A higienização dos espaços é feita diariamente pelo pessoal técnico de cada uma das áreas.

A otária sul-africana pertença do Aquário Vasco da Gama encontrava-se numa instalação única com uma piscina interior com acesso ao exterior e respetivas áreas secas (Figura 19).

Figura 19. Otária sul-africana na instalação do Aquário Vasco da Gama.
Na fotografia observa-se a piscina interior, a zona seca e a passagem para a área exterior.
Fonte: <http://videos.sapo.pt/mdkz1On4cC2kzuNpgm0L>



2.2 Caracterização das amostras, processamento e armazenamento

No Zoomarine a colheita das amostras fecais decorreu de 20 de janeiro a 6 de março de 2016. Por indivíduo, foi colhida 1 amostra de fezes por semana, durante 4 semanas consecutivas, sendo as amostras denominadas sequencialmente por: 1ª colheita, 2ª colheita, 3ª colheita e 4ª colheita (Anexo 2). De modo a assegurar a correspondência específica das amostras aos animais, os mesmos foram, de forma individualizada, mantidos em espaços isolados durante curtos períodos de tempo, sendo as fezes prontamente recolhidas do solo pelos treinadores para recipientes estéreis, identificadas e transportadas para o laboratório do Departamento Veterinário do Zoomarine sob refrigeração. Uma vez aí, cada amostra foi subdividida em 5 réplicas e armazenada a -20°C.

Foram posteriormente transportadas até ao Laboratório de Virologia da FMV-ULisboa, sob refrigeração, seguidas de armazenamento a -20°C.

A colheita da amostra fecal do indivíduo do Aquário Vasco da Gama ocorreu a 16 de junho, tendo sido transportada no mesmo dia, sob refrigeração, para o Laboratório de Virologia da FMV-ULisboa e armazenada a -20°C. Precisamente porque esta colheita foi posterior ao início dos procedimentos laboratoriais, nem todas as metodologias aplicadas aos restantes indivíduos foram utilizadas nesta amostra em específico.

No total contabilizaram-se 67 recolhas de amostras fecais.

No decorrer deste trabalho foram analisadas todas as amostras correspondentes à 1ª colheita (n=19), 1 amostra de cada indivíduo.

A cada indivíduo correspondeu um código animal, organizado durante o estágio curricular, e que se manteve em todas as fases de elaboração deste trabalho. Assim, a cada espécie foi atribuída uma letra, com base na primeira letra do respetivo nome científico (“A” para a subespécie *Arctocephalus pusillus pusillus*, “Z” para a espécie *Zalophus californianus*, “P”, para a espécie *Phoca vitulina* e “H” para a espécie *Halichoerus grypus*) e um número, atribuído consoante o número de indivíduos existente por espécie.

2.3 Extração de ácidos nucleicos

As amostras fecais foram diluídas em tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato), na proporção de 1gr de fezes para 2ml de tampão, e vigorosamente homogeneizadas. Após centrifugação à temperatura ambiente, a 13.000xg durante 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e filtrado num filtro de 0.45µm (Merck Millipore®) para remoção de detritos celulares e bactérias.

Para extração de ácidos nucleicos virais utilizou-se o kit QIAmp viral RNA Minikit (Quiagen®), e procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante. A 140µL de sobrenadante adicionou-se 560µL de um tampão desnaturante (AVL) e 5,6µL de RNA *carrier*. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 560µL de etanol a 100% para precipitação dos ácidos nucleicos e a amostra foi aplicada numa coluna de sílica e lavada com duas soluções de lavagem alcoólicas (AW1 e AW2) e sucessivas centrifugações a 13.000xg durante 1 minuto. Os ácidos nucleicos foram finalmente eluídos na membrana por aplicação de um tampão aquoso (AVE). Posteriormente cada amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando o Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®) (Anexo 3). As extrações foram conservadas a -80°C para futuras utilizações.

2.4 Amplificação de ácidos nucleicos

Para amplificação de astrovírus e sapovírus, vírus de genoma RNA, recorreu-se à técnica de *one step* RT-PCR, que consiste na realização da transcrição reversa e amplificação, no mesmo tubo. Nomeadamente:

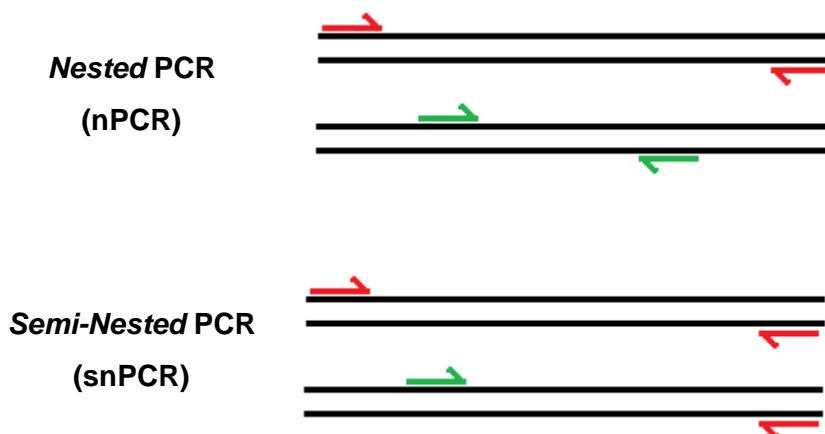
- (i) um passo de transcrição reversa de RNA para DNA complementar (cDNA) que serve de modelo (ou *template*), catalisado por um enzima RT (transcriptase reversa), e
- (ii) um passo de amplificação por PCR – uma reação em cadeia catalisada por um enzima DNA polimerase termorresistente (*Taq* polimerase), que amplifica exponencialmente uma região específica de DNA (ácido desoxirribonucleico) definida por dois oligonucleótidos sintéticos (*primers*).

Para detecção de bocavírus, um vírus de genoma DNA, utilizou-se diretamente a amplificação por PCR. Esta técnica de amplificação envolve 3 fases distintas, a temperaturas específicas, que se repetem por um conjunto de ciclos. Cada ciclo de amplificação conduz à amplificação do dobro das moléculas alvo iniciais (Videira, 2001). Essas fases são:

- (i) Desnaturação, que consiste na separação da dupla cadeia de DNA;
- (ii) Hibridação, que consiste no emparelhamento dos *primers* que flanqueiam as regiões específicas do DNA da amostra que se quer amplificar;
- (iii) Extensão ou síntese de novas cadeias de DNA a partir da DNA polimerase que utiliza como molde a cadeia a que cada *primer* está emparelhado.

Em algumas das amplificações realizadas neste trabalho recorreu-se a uma modalidade designada *Nested PCR* (nPCR), que consiste numa modificação da PCR convencional em que se amplifica em primeiro lugar um fragmento externo específico de maiores dimensões, e posteriormente se amplifica um fragmento interno ao primeiro (Haff, 1994). Assim são necessários 2 pares de *primers*: 1 par (*forward* e *reverse*) exterior e 1 par (*forward* e *reverse*) interior. Numa outra adaptação designada por *Semi-Nested PCR* (snPCR) um dos *primers* utilizados no primeiro passo, é novamente utilizado no segundo, como representado na Figura 20. Em qualquer um dos modelos, o produto final da reação da primeira PCR é utilizado como *template* na segunda amplificação.

Figura 20. Esquema representativo de duas estratégias de amplificação de ácidos nucleicos: nPCR e snPCR.



A utilização destas modalidades permite aumentar a sensibilidade e especificidade das amplificações pretendidas, tentando minimizar as ligações inespecíficas que possam ocorrer, principalmente quando se utilizam *primers* degenerados que diminuem drasticamente a especificidade da reação (Nix, Oberste, & Pallansch, 2006). Os *primers* degenerados são especialmente úteis quando se pretende estudar espécies (de vírus, neste caso) cujo genoma

ainda não foi sequenciado, desconhecendo-se assim a sequência nucleotídica exata à qual os *primers* se irão emparelhar (Iserete *et al.*, 2013).

O código genético é caracterizado por ser degenerado, na medida em que existe mais que um codão que codifica para um mesmo aminoácido, com exceção da metionina e do triptofano. Assim, também os *primers* são designados de degenerados quando são formados por um conjunto de sequências, e não apenas por uma sequência de nucleótidos específica. Deste modo, estes *primers* tentam fazer convergir os vários codões possíveis responsáveis pela tradução de um dado aminoácido. A tabela que atualmente converge todas as alternativas possíveis foi inicialmente criada pela IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (IUPAC-IUB, 1970), e está representada na Tabela 3.

Tabela 3. Nomenclatura para representação de polinucleótidos segundo a IUPAC.
Fonte: Oliveira, Oliveira, Souza, Santos, & Lima (2015)

Símbolo	Bases representadas
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

Os *primers* degenerados utilizados neste trabalho, e que não estejam indicados como obtidos de outras publicações, resultaram da construção de alinhamentos de várias sequências nucleotídicas de genomas completos ou parciais de astrovírus, bocavírus e sapovírus, identificadas e publicadas por Li, Shan, e colaboradores (2011). Estas sequências virais, cujo nome é sempre precedido da sigla CSL (leões-marinhos californianos, em inglês *California Sea Lions*) estão disponíveis *online* na base de dados do *GenBank* do NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Quer o desenho de *primers* degenerados ou de *primers* não degenerados, resultaram do alinhamento múltiplo dessas várias sequências nucleotídicas, a partir do *software* Clustal Omega (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) seguido de seleção e/ou desenho manual dos *primers*, ou em alternativa, obtidos com recurso ao *software* PRIMA CLADE (disponível em: <http://primaclade.org/cgi-bin/primaclade.cgi>) que propõe

automaticamente *primers* moderadamente degenerados. Em qualquer um dos casos, a escolha final dos *primers* teve em consideração as zonas de maior conservação entre os genomas alinhados, a dimensão do fragmento que se pretendia amplificar e os locais de maior conservação genética, evitando-se grandes degenerações nas últimas 3 bases azotadas da extremidade 3'.

As tabelas que se seguem (Tabela 4, 5 e 6) pretendem elucidar de forma pragmática as diversas técnicas de obtenção dos *primers* para cada um dos vírus que se pretendia amplificar, bem como as várias metodologias de amplificação que ao longo de 4 meses de trabalho laboratorial foram sendo abordadas, numa lógica de tentativa e erro.

Tabela 4. *Primers* utilizados para amplificação de astrovírus e respetivas técnicas de amplificação.

Técnica de amplificação		Nome dos <i>primers</i>	Sequências dos <i>primers</i> (5' → 3')	Domínio alvo	Dimensão do fragmento
RT-PCR	Forward	AstV_1b_For1	ATGGACCTACTRTGTGGGGA	ORF1b	119pb
	Reverse	AstV_1b_Rev1	DGCCCAGTCTGCRAACCYAC		
RT-PCR	Forward	AstV_1b_For2	GRCCHRACAAAGAMMMWTGGA	ORF1b	449pb
	Reverse	AstV_1b_Rev2	AAATGCGATGCAGTTGCTCC		
RT-snPCR	1 st step	Forward	Astr4811F	ORF2	660pb
	Reverse	Astr5819R	TCATTNGTGTYNGTNANCCACCA ¹		
	2 nd step	Forward	Astr5159F		
	Reverse	Astr5819R	TCATTNGTGTYNGTNANCCACCA ¹		
RT-snPCR	1 st step	Forward	panAVF11	Região conservada da RdRp	422pb
		panAVF12	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA ²		
	2 nd step	Reverse	panAVR1		
		panAVR1	GGYTTKACCCACATNCCRAA ²		

¹Sequências de *primers* degenerados como descritas em Atkins *et al.*, 2009. ²Sequências de *primers* degenerados como descritas em Chu *et al.*, 2008.

Tabela 5. *Primers* utilizados para amplificação de sapovírus e respetiva técnica de amplificação.

Técnica de amplificação		Nome dos <i>primers</i>	Sequências dos <i>primers</i> (5' → 3')	Domínio alvo	Dimensão do fragmento
RT-PCR	Forward	SapoV_For	GCATGTGCTTTGCCTCAGTC	ORF2	361pb
	Reverse	SapoV_R	GTGGCAGTTGCTTCATCACC		

Tabela 6. *Primers* utilizados para amplificação de bocavírus e respectivas técnicas de amplificação.

Técnica		Nome dos <i>primers</i>	Sequências dos <i>primers</i> (5' → 3')	Domínio alvo	Dimensão do fragmento
PCR	<i>Forward</i>	BocaV_VP1_F1	GATAAGCCGGGTCCATCAGG	VP1	403pb
	<i>Reverse</i>	BocaV_VP1_R1	AAGGAGTGCTGATGCCAGTC		
PCR	<i>Forward</i>	BocaV_VP1_F2	GGGAACCAGACAGTGGTACG	VP1	587pb
	<i>Reverse</i>	BocaV_VP1_R2	TATCGTTGTTGACCCACCCG		
snPCR	1 st step	<i>Forward</i>	BocaV_NS1_F1	NS1	336pb
		<i>Reverse</i>	BocaV_NS1_R1		
	2 nd step	<i>Forward</i>	BocaV_NS1_F1		
		<i>Reverse</i>	BocaV_NS1_R2		
nPCR	1 st step	<i>Forward</i>	BoVos	NS1 <i>primers</i> conservados para qualquer vírus do género <i>Bocavirus</i>	458pb
		<i>Reverse</i>	BoVoa		
	2 nd step	<i>Forward</i>	BoVis		
		<i>Reverse</i>	BoVia		

¹Sequências de *primers* degenerados como descritas em Sharp *et al.*, 2010.

As reações de amplificação de vírus RNA foram realizadas com o qScript™ XLT *One-Step* RT-PCR *Kit*.

Para um volume final de 25µL, utilizou-se um volume de 12,5µL de uma mix *One-Step ToughMix* (2X), 0,5µL de um tampão *GelTrack Loading Dye* (50X), 1µL de enzima qScript™ XLT *One-Step Reverse Transcriptase* (25X), 10 a 20 pmol de *primer forward* e o mesmo de *primer reverse* aos quais se adicionou 3µL de RNA viral.

As reações de PCR foram realizadas com do *kit* comercial 5 PRIME MasterMix (2.5x) que contém o tampão de reação, o enzima *Taq* polimerase, MgCl₂ e dNTP's necessários à reação de amplificação.

Os ciclos térmicos utilizados no termociclador Doppio (VWR®) encontram-se descritos nas Tabela 7, 8 e 9, respetivamente para astrovírus, sapovírus e bocavírus.

Tabela 7. Ciclos térmicos utilizados na RT-PCR para os diferentes *primers* de astrovírus.

Domínio alvo	Transcrição reversa	Passo inicial de desnaturação	Ciclos da PCR			Passo final de extensão
			Desnaturação	Hibridação	Extensão	
ORF1b	42°C/30 min	95°C/10 min	95°C/10 seg	50-55°C/30 seg	68°C/30 seg	68°C/10 min
			40 ciclos			
ORF2	42°C/15 min	95°C/3 min	95°C/15 seg	50°C/20 seg	68°C/30 seg	68°C/10 min
			40 ciclos			
	50°C/30 min	94°C/5 min	94°C/30 seg	45°C/30 seg	72°C/60 seg	72°C/10 min
			36 ciclos			
RdRp	50°C/30 min	94°C/5 min	94°C/30 seg	45°C/30 seg	72°C/60 seg	72°C/10 min
			36 ciclos			

Tabela 8. Ciclos térmicos utilizados na RT-PCR para os *primers* de sapovírus.

Domínio alvo	Transcrição reversa	Passo inicial de desnaturação	Ciclos da PCR			Passo final de extensão
			Desnaturação	Hibridação	Extensão	
ORF2	42°C/30 min	95°C/10 min	95°C/10 seg	50°C/30 seg	68°C/30seg	68°C/10 min
			40 ciclos			

Tabela 9. Ciclos térmicos utilizados na PCR para os diferentes *primers* de bocavírus.

Domínio alvo	Passo inicial de desnaturação	Ciclos da PCR			Passo final de extensão
		Desnaturação	Hibridação	Extensão	
VP1	95°C/10 min	95°C/15 seg	50°C/30 seg	68°C/30 seg	68°C/10 min
		40 ciclos			
NS1	94°C/15 min	94°C/30 seg	45°C/30 seg	68°C/60 seg	68°C/10 min
		40 ciclos			
NS1	94°C/5 min	94°C/30 seg	45°C/30 seg	72°C/60 seg	72°C/10 min
		36 ciclos			

Os produtos finais resultantes das reações de amplificação em cadeia foram visualizados, após eletroforese horizontal em géis de agarose a 1,5%, na presença de 5% de gelRED™. A migração dos produtos de amplificação decorreu com corrente constante a 90 volts. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V* (Nzytech).

As bandas amplificadas com tamanho espectável foram observadas sob luz ultravioleta, cortadas e purificadas. O ácido nucleico foi recuperado através do kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research®), de acordo com as instruções do fabricante. As secções de agarose foram excisadas, dissolvidas em 3 volumes de tampão dissolvente a 55°C durante 10 a 15 minutos. A mistura assim obtida foi transferida para uma coluna de purificação. Após lavagem com duas soluções de lavagem o DNA foi eluído, por centrifugação, em 6µL de tampão.

2.5 Sequenciação de DNA e análise de sequências nucleotídicas e aminoacídicas

Os produtos de amplificação foram diretamente sequenciados pela STABVIDA (Portugal) pelo método de Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). As reações de sequenciação foram realizadas com recurso aos pares de *primers* utilizados nas reações de amplificação anteriormente descritas.

Para avaliar a especificidade das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação, utilizou-se o programa *BLAST* (ferramenta bioinformática, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que permite a comparação com todas as sequências depositadas na base de dados do Genbank NCBI.

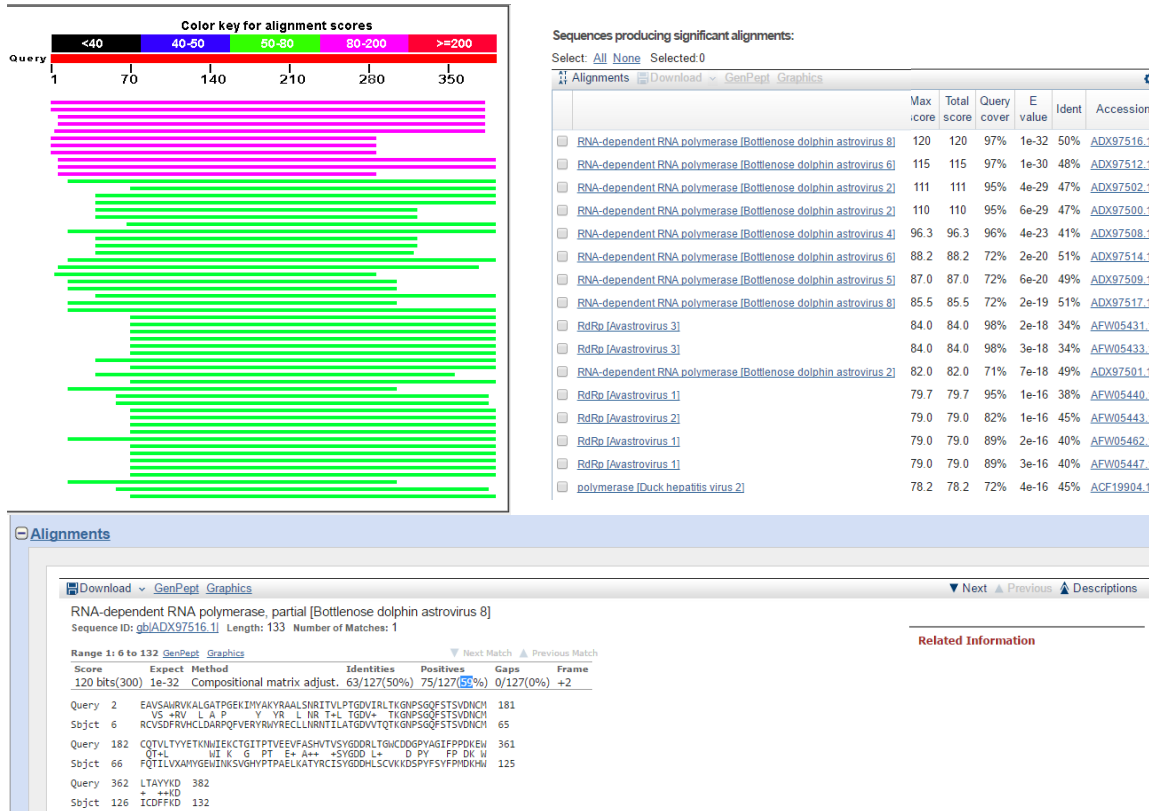
Recorreu-se à funcionalidade *BLASTx*, que permite comparar sequências nucleotídicas codificantes, contra uma base de dados de sequências proteicas, permitindo identificar possíveis proteínas a partir de uma sequência nucleotídica desconhecida, como era o caso das sequências em análise neste trabalho.

Dessa pesquisa, resulta a visualização de um gráfico de cores e um relatório com informações relativas ao alinhamento da sequência que se pretende analisar com inúmeras outras sequências que apresentem um nível significativo de similaridade com a sequência inserida, como representado na Figura 21.

Um dos parâmetros tido em conta para esta análise foi o valor de *E-value* (do inglês, *expected value*) que representa o valor estatístico de um “falso positivo”, indicando a probabilidade de o alinhamento ter sido obtido por mero acaso. Quanto menor o *E-value*, maior a probabilidade do resultado ser estatisticamente significativo. Na análise dos BLAST realizados, apenas foram considerados resultados com um *E-value* inferior a 1×10^{-5} .

Figura 21. Aspetto de um *BLASTx*.

Na figura pode observar-se: em cima e à esquerda o alinhamento com cores com correspondência aos valores de E-value que permitem avaliar visualmente a fiabilidade do alinhamento; em cima e à direita diferentes sequências com alinhamentos considerados significativos, com os respetivos, nomes, scores e códigos de acesso; em baixo, um exemplo de um dos alinhamentos com todos os detalhes acerca do mesmo.



Para análise evolutiva das sequências aminoacídicas foram construídas árvores filogenéticas recorrendo ao programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013). A análise das relações filogenéticas entre sequências aminocídicas homólogas foi determinada com base no critério da máxima verosimilhança (ML do inglês, *Maximum-Likelihood*), segundo o modelo criado por Le & Gascuel (2008), e no critério de junção de vizinhos (NJ do inglês, *Neighbor-Joining*). Para validação dos resultados recorreu-se ao valor de *bootstrap* que reflete a robustez da análise filogenética produzida, estimando um nível de confiança para os alinhamentos e agrupamentos gerados.

3. Resultados

3.1 Análise dos produtos de amplificação

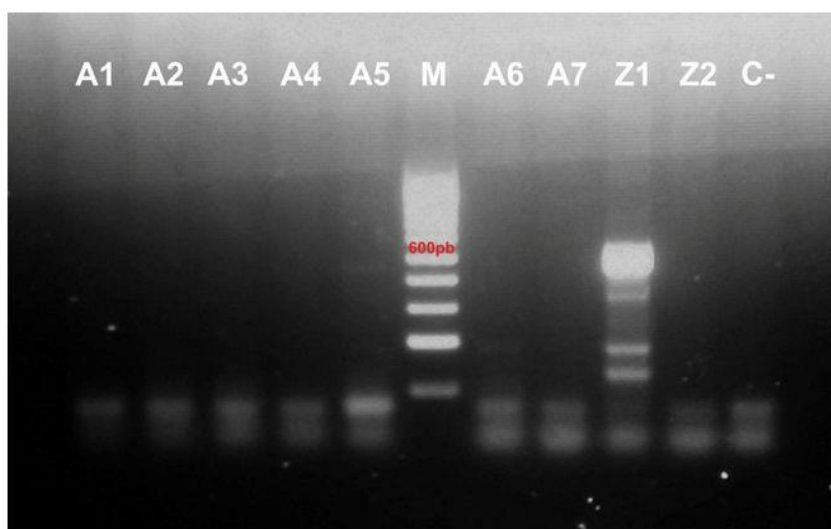
A partir das diferentes metodologias descritas no capítulo anterior, nomeadamente, os *primers* obtidos com recurso a técnicas de bioinformática e/ou descritos em publicações anteriores, as diferentes técnicas de amplificação de sequências nucleotídicas desejadas para astrovírus, sapovírus e bocavírus, e fazendo alternar os ciclos térmicos de amplificação em função dos resultados preliminares alcançados, realizou-se um total de 43 PCR's e obtiveram-se 16 produtos de amplificação de tamanhos espectáveis, posteriormente sequenciados, cujos detalhes serão descritos de seguida.

De referir que todas as bandas para as quais os resultados da amplificação obtidos foram negativos, ou revelaram a presença de produtos de amplificação não específicos, não serão mencionados por não serem considerados relevantes na argumentação deste trabalho.

3.1.1 Produtos de amplificação utilizando *primers* específicos para astrovírus

A amplificação dos ácidos nucleicos de astrovírus por RT-snPCR utilizando os primers Astr4811F/Astr5819R na primeira reação, e os primers Astr5159F/Astr5819R na segunda reação (Tabela 4), com uma temperatura de hibridação de 50°C (Tabela 7), resultou num produto de amplificação com a dimensão esperada (660pb) na amostra Z1 (Tabela 4; Figura 22). Apesar da identificação de *mispriming*, ou seja, a ocorrência de hibridação inespecífica dos *primers* dando origem à formação de mais três bandas com diferentes pesos moleculares para uma mesma amostra, este produto foi selecionado para posterior sequenciação.

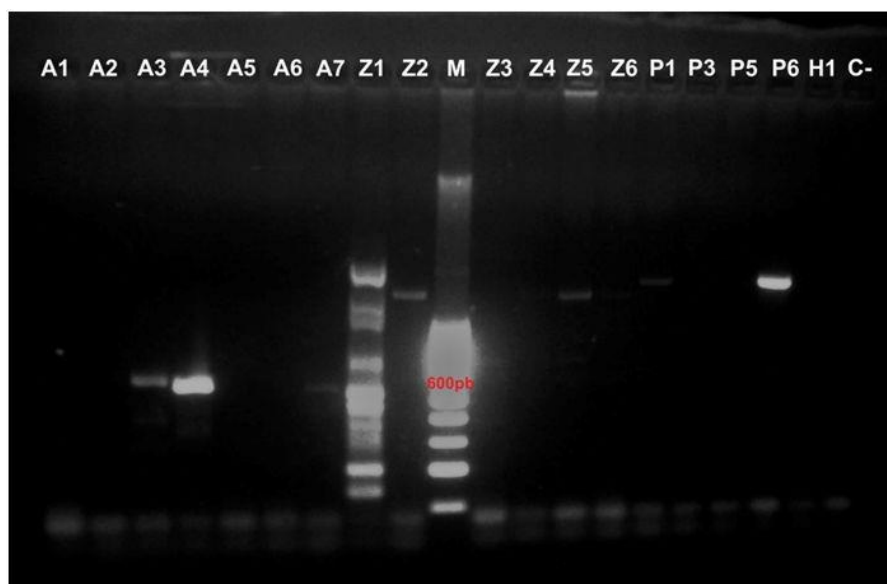
Figura 22. Produtos de amplificação de 9 amostras (A1-A7; Z1 e Z2) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.



M: marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V; C-: controlo negativo.

Numa segunda abordagem, com estes mesmos pares de *primers*, utilizando uma temperatura de hibridação menos restrigente (45°C), obteve-se um produto de amplificação com a dimensão esperada (660pb) nas amostras A3, A4, A7, embora com diferentes intensidades. (Figura 23). A amostra Z1 apresentou um padrão de *mispriming* que impediu a identificação da banda do peso molecular correto, não tendo sido considerada para sequenciação.

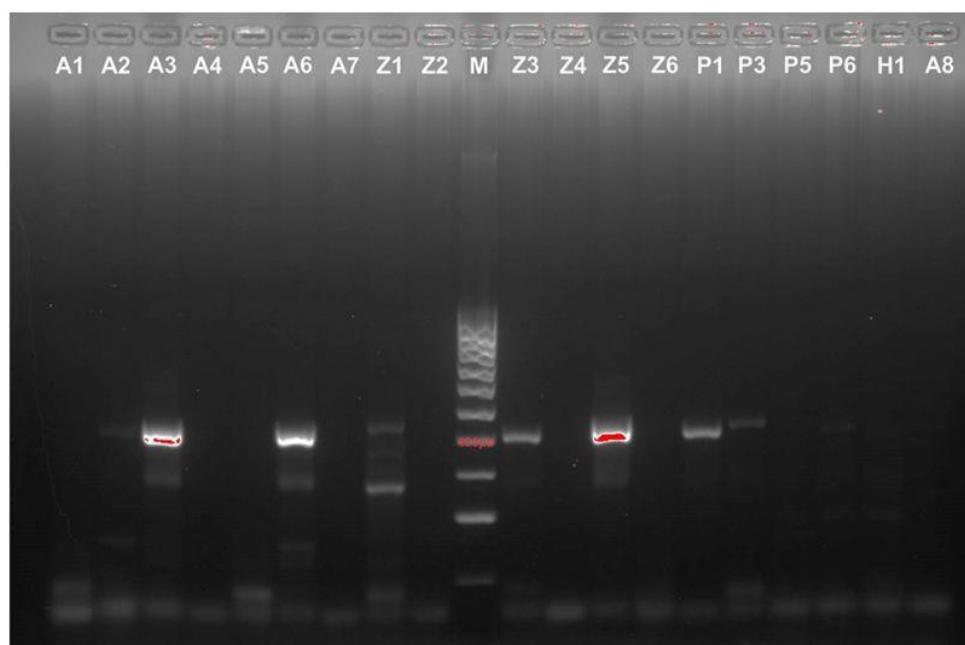
Figura 23. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.



M: marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V*; C-: controlo negativo.

A amplificação dos ácidos nucleicos virais por RT-snPCR na presença do par de *primers* panAVF11+panAVF12/panAVR1 na primeira reação, e do par panAVF21+AVF22/AVFR1 (Tabela 4) num segundo passo, com uma temperatura de hibridação de 45°C (Tabela 7) permitiu a amplificação em 8 amostras (A2, A3, A6, Z3, Z5, P1, P3, P6) de produtos com a dimensão aproximada ao produto de amplificação esperado (422pb), indicativas de potenciais produtos compatíveis com a sequência codificante do domínio da RdRp, embora com diferentes intensidades. Com exceção da amostra P1, as restantes 7 amostras apresentavam *mispriming* (Figura 24).

Figura 24. Produtos de amplificação de 19 amostras (A1-A8; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por RT-snPCR em gel de agarose a 1,5%.



M: marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V

Assim, do conjunto destes dados resultou um total de 12 fragmentos de DNA amplificados com recurso a *primers* específicos para astrovírus que foram purificados, como descrito em Material e Métodos, e posteriormente sequenciados pela empresa de biotecnologia STABVIDA.

Apresenta-se de seguida uma associação entre os fragmentos de DNA enviados para sequenciação e as amostras e espécies animais correspondentes (Tabela 10):

Tabela 10. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de *primers* específicos para astrovírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.

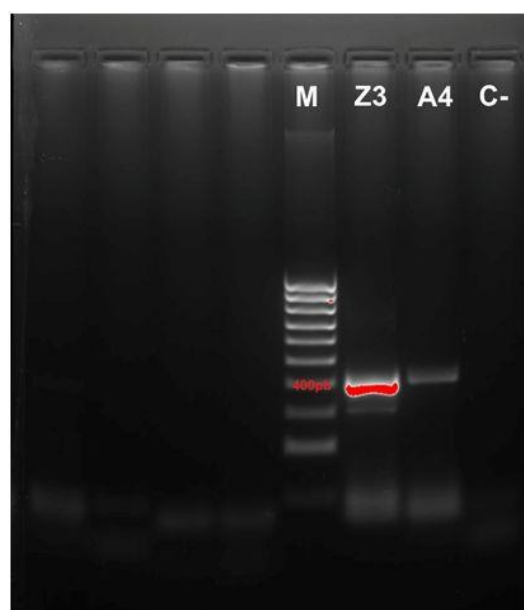
Código da Amostra	Número de fragmentos de DNA enviados para sequenciação	Espécie animal
A2	1	Otária sul-africana
A3	2	Otária sul-africana
A4	1	Otária sul-africana
A6	1	Otária sul-africana
A7	1	Otária sul-africana
Z1	1	Leão-marinho californiano
Z3	1	Leão-marinho californiano
Z5	1	Leão-marinho californiano
P1	1	Foca comum
P3	1	Foca comum
P6	1	Foca comum
Total	11	3

3.1.2 Produtos de amplificação utilizando *primers* específicos para sapovírus

A reamplificação dos ácidos nucleicos virais por RT-PCR com uma temperatura de hibridação de 50°C (Tabela 8) na presença dos pares de *primers* SapoV_For/SapoV_R (Tabela 5) revelou a presença de 2 bandas correspondentes às amostras Z3 e A4, com aproximadamente a dimensão do fragmento esperado (361pb), indicativas de potenciais produtos compatíveis com a sequência codificante do domínio da ORF2, o gene codificante de uma proteína estrutural menor dos sapovírus (Figura 25).

Ambas as bandas amplificadas com recurso a *primers* específicos para sapovírus foram purificadas e posteriormente sequenciadas (Tabela 11).

Figura 25. Produtos de reamplificação de 2 amostras (Z3 e A4) por RT-PCR em gel de agarose a 1,5%.



M: marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V*; C-: controlo negativo

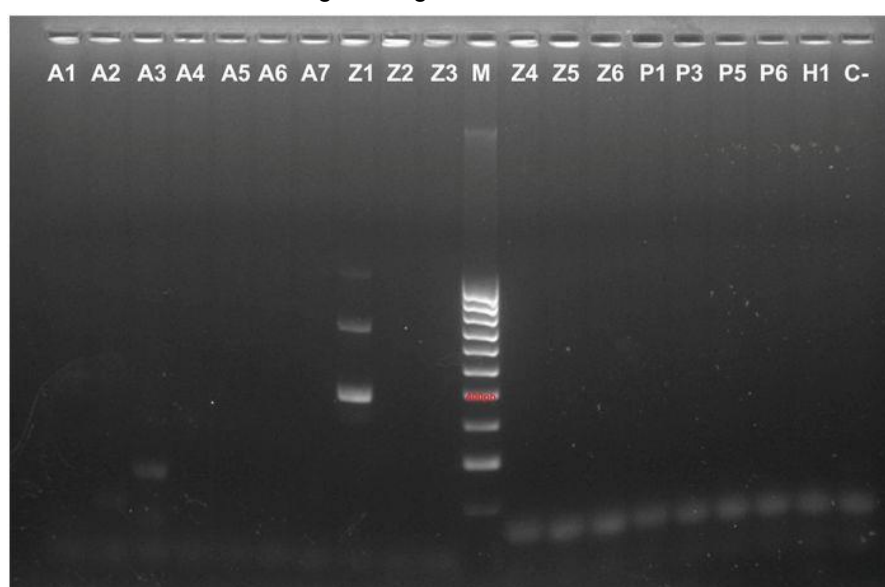
Tabela 11. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de *primers* específicos para sapovírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.

Código da Amostra	Número de fragmentos de DNA enviados para sequenciação	Espécie animal
A4	1	Otária sul-africana
Z3	1	Leão-marinho californiano
Total	2	2

3.1.3 Produtos de amplificação utilizando *primers* específicos para bocavírus

A amplificação dos ácidos nucleicos virais por PCR com uma temperatura de hibridação de 50°C (Tabela 9) na presença dos pares de *primers* BocaV_VP1_F1/BocaV_VP1_R1 (Tabela 6) revelou a presença de apenas 1 banda com aproximadamente a dimensão do fragmento esperado (403pb) na amostra Z1, embora com *mispriming* (Figura 26). Ainda assim, e dada a intensidade da banda de peso molecular espectável, considerou-se este produto para posterior sequenciação, na medida em que eventualmente este pudesse ser compatível com a sequência codificante do domínio da VP1 dos bocavírus.

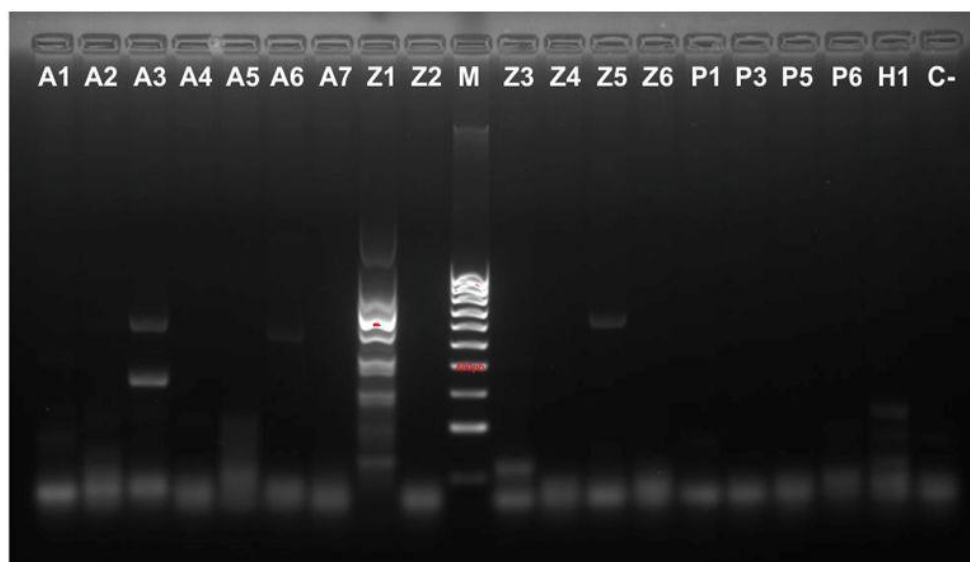
Figura 26. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por PCR em gel de agarose a 1,5%.



M: marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V; C-: controlo negativo

A amplificação dos ácidos nucleicos virais por snPCR com uma temperatura de hibridação de 45°C (Tabela 9) na presença dos pares de *primers* BocaV_NS1_F1/BocaV_NS1_R1 num primeiro passo do *semi-nested* e dos pares de *primers* BocaV_NS1_F1/BocaV_NS1_R2 (Tabela 6) deu origem a 1 banda (amostra A3) com aproximadamente a dimensão do fragmento esperado (336pb), que poderia corresponder a um produto de amplificação compatível com a sequência codificante do domínio do gene NS1, codificante de proteínas não estruturais dos bocavírus (Figura 27).

Figura 27. Produtos de amplificação de 18 amostras (A1-A7; Z1-Z6; P1, P3, P5-P6; H1) por PCR em gel de agarose a 1,5%



M: marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V*; C-: controlo negativo

Do conjunto destes resultados, 2 fragmentos de DNA amplificados com recurso a *primers* específicos para bocavírus foram purificados, e posteriormente sequenciados (Tabela 12).

Tabela 12. Identificação dos fragmentos de DNA amplificados a partir de *primers* específicos para bocavírus e associação com a respetiva amostra e espécie animal.

Código da Amostra	Número de fragmentos de DNA enviados para sequenciação	Espécie animal
Z1	1	Leão-marinho californiano
A3	1	Otária sul-africana
Total	1	2

3.2 Análise dos produtos sequenciados

Como explicado em Material e Métodos, para avaliação da especificidade das sequências obtidas nucleotídicas obtidas recorreu-se à funcionalidade *BLASTx*. Observou-se assim que, das 16 sequências de DNA analisadas, 3 produtos de amplificação

Figura 24) resultantes da RT-snPCR com recurso ao par de *primers* panAVF11+panAVF12/panAVR1 e panAVF21+AVF22/AVFR1 (Tabela 4) emparelharam com sequências codificantes do domínio da RdRp dos astrovírus, com dimensões de 391pb, 412pb e 427pb. Estas sequências correspondem respetivamente às amostras A3, Z5 e P3 (Tabela 10) e são o resultado da identificação de 3 amostras positivas na população de pinípedes em estudo (15.7%; 3/19).

Os resultados dos *BLASTx* evidenciaram que as sequências aminoacídicas parciais codificantes da RdRp dos astrovírus das amostras A3, Z5 e P3 correspondentes a 25% do comprimento total da polimerase viral, apresentaram uma similaridade aminoacídica entre 31 a 51% com astrovírus de espécies animais tão díspares como o golfinho-roaz, a baleia-anã ou algumas espécies de aves, como o peru ou o pato (Figura 21).

Os restantes produtos amplificados mostraram ser apenas sequências aleatórias sem associação aos vírus que se pretendiam identificar.

3.3 Análise dos resultados em função das variáveis em estudo

Com relação à população em estudo (n=19), estes resultados evidenciaram positividade a astrovírus para 1 indivíduo da subespécie *Arctocephalus pusillus pusillus* (amostra A3), 1 indivíduo da espécie *Zalophus californianus* (amostra Z5) e 1 indivíduo da espécie *Phoca vitulina* (amostra P3).

Estes dados resultam numa frequência de 15.7% (3/19) de pinípedes com amostras fecais positivas a astrovírus e 0% com relação aos vírus sapovírus e bocavírus.

Os 3 indivíduos cujas amostras fecais foram positivas a astrovírus, correspondem:

- a uma otária sul-africana do sexo masculino, com uma idade compreendida entre os 11 e os 15 anos, saudável e sem sintomatologia gastrointestinal;
- a um leão-marinho californiano fêmea, que faz parte da faixa etária dos 16-20 anos, gestante à data da colheita e sem sintomatologia gastrointestinal;
- a uma foca comum do sexo masculino, com uma idade compreendida entre os 11 e os 15 anos, que apresentava consistentemente fezes brandas, sendo este o único sinal clínico a reportar à data da colheita.

Com relação à avaliação das amostras ao longo do tempo, por constrangimentos de tempo não foi possível à autora testar todas as amostras fecais colhidas, pelo que apenas a 1ª colheita de cada um dos 19 indivíduos deste estudo foi submetida às metodologias anteriormente descritas. Assim sendo, não é possível a elaboração de qualquer correlação entre os achados laboratoriais e esta variável.

3.4 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas de astrovírus das amostras A3, Z5 e P3 foram traduzidas e alinhadas com diferentes sequências virais do género *Mamastrovirus* (de mamíferos marinhos e terrestres) e com duas sequências virais do género *Avastrovirus*.

Estas sequências foram posteriormente submetidas a alinhamento com outras sequências aminoacídicas codificantes da RdRp viral, de diversas estirpes de astrovírus, algumas delas identificadas numa mesma espécie, com os números de acesso presentes na seguinte tabela (Tabela 13):

Tabela 13. Identificação das 38 sequências aminoacídicas utilizadas na construção da árvore filogenética com o respetivo número de acesso e nome do vírus.

Número de Acesso	Nome do vírus
ACR54279.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 1
ADX97503.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 2
ADX97504.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 3
ADX97508.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 4
ADX97510.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 5
ADX97514.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 6
ADX97515.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 7
ADX97517.1	astrovírus de golfinho-roaz tipo 8
ACR54273.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 2
ACR54275.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 3
AEM37615.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 4
AEM37618.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 5
AEM37621.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 6
AEM37633.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 7
AEM37624.1	
AEM37627.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 8
AEM37630.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 9
AEM37636.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 10
AEM37633.1	
AEM37639.1	astrovírus de leão-marinho californiano tipo 11
AGX15184.1	astrovírus humano tipo 1
AFR23487.1	astrovírus humano tipo 2
ADE09294.1	astrovírus humano tipo 3
AGV40904.1	astrovírus humano tipo 4
AFE84779.1	astrovírus humano tipo 5
ACV92106.1	astrovírus humano tipo 6
BAO31557.1	astrovírus humano tipo 8
YP_009130648.1	astrovírus canino
ADF57166.1	astrovírus felino
AFN25952.1	astrovírus de porco
AAO59327.1	astrovírus de vison
ACR54277.1	astrovírus de leão-marinho-de-Steller
ADX97520.1	astrovírus de baleia-anã
ADX97519.1	
NP_059945.2	astrovírus de ovino
CAB95003.1	
AID55210.1	astrovírus de pato
ABX46589.1	astrovírus de peru

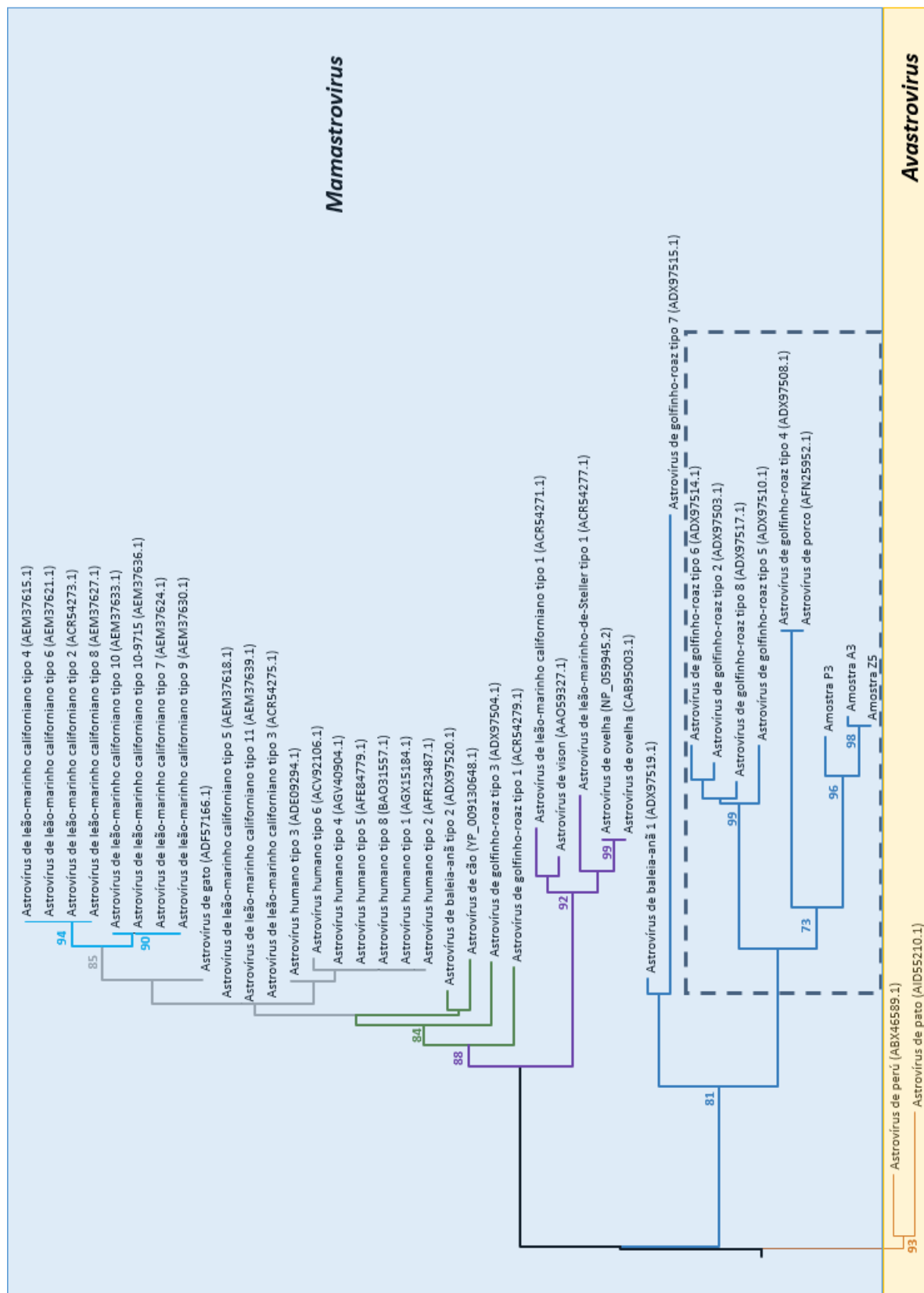
Da análise filogenética deste alinhamento de 41 sequências aminoacídicas resultou uma árvore consenso, que permitiu a avaliação das relações filogenéticas entre as diferentes sequências de astrovírus (Figura 28). A árvore foi desenhada à escala, sendo que os comprimentos dos ramos (na horizontal) correspondem aos valores de distância genética. As diferentes cores representam os diferentes agrupamentos que foram identificados utilizando como *cutoff* um *bootstrap* de 75%.

Da análise desta árvore observa-se a formação de 2 agrupamentos distintos, correspondentes aos géneros *Avastrovírus*, onde se incluem as sequências aminoacídicas dos astrovírus de peru e de pato, e os *Mastrovírus*, onde se incluem as restantes sequências.

Pode observar-se que as sequências aminoacídicas das amostras A3, P3 e Z5 formam um agrupamento que pode ser discriminado dada a confiança estimada a partir do valor de *bootstrap* representado no nó dos ramos que as precedem (96%). De referir ainda que estas amostras alinham filogeneticamente com algumas sequências aminoacídicas de astrovírus identificadas em golfinhos-roazes, nomeadamente com os astrovírus tipo 2, 4, 5, 6 e 8 e com um astrovírus de porco. Do conjunto destas sequências podem distinguir-se apenas 2 agrupamentos com fiabilidade estatística: aquele representado por um valor de *bootstrap* de 99% e o agrupamento do qual fazem parte as novas sequências de astrovírus identificadas neste trabalho.

Figura 28. Árvore filogenética da RdRp dos astrovírus compreendendo 41 sequências aminoacídicas de astrovírus de diferentes espécies animais, entre elas as correspondentes às amostras A3, Z5 e P3.

No conjunto azul estão representados os vírus cujos hospedeiros são mamíferos, pertencendo ao género *Mamastrovirus*, e a amarelo os vírus cujos hospedeiros são aves, pertencendo ao género *Avastrovirus*. A tracejado encontra-se o agrupamento diferenciado do qual fazem parte as amostras positivas neste trabalho.



V. DISCUSSÃO

Como demonstrado ao longo do capítulo anterior, nenhuma das primeiras metodologias de trabalho com recurso aos pares de *primers* desenhados a partir das sequências nucleotídicas identificadas em leões-marinhos californianos por Li, Shan, *et al.* (2011) foram bem sucedidas, para qualquer um dos 3 vírus. Por isso mesmo, a certa altura, experimentaram-se novas abordagens com relação apenas aos bocavírus e aos astrovírus, os vírus mais prevalentes nesse mesmo estudo.

Com relação aos astrovírus, sabe-se que a família *Astroviridae* possui uma enorme diversidade genética, tendo-se demonstrado que mais de 60 espécies animais são suscetíveis à infecção pelo vírus, e que no caso concreto dos mamíferos marinhos, os astrovírus já foram detetados em 6 espécies, designadamente: leão-marinho californiano (*Zalophus californianus*), leão-marinho-de-Steller (*Eumelopias jubatus*), golfinho-roaz (*Tursiops truncatus*), baleia-anã, (*Balaenoptera acutorostrata*) orca (*Orcinus orca*) e golfinho comum (*Delphinus delphis*); o que não sucede no caso dos sapovírus ou dos bocavírus, apenas descritos em leões-marinhos californianos. Assim, numa primeira fase adotaram-se os métodos de amplificação descritos por Atkins *et al.* (2009) e posteriormente os descritos por Chu *et al.* (2008). Os *primers* retirados do primeiro artigo correspondiam a *primers* degenerados desenhados para flanquear regiões conservadas da cápside dos astrovírus, codificada pelo domínio da ORF2. Foram utilizados pelos autores para amplificação de astrovírus, como método diagnóstico de um surto de doença gastrointestinal em 7 chitas num centro de reprodução dos EUA. Os *primers* retirados do artigo de Chu *et al.*, (2008) correspondem a *pan*-astrovírus que flanqueavam regiões conservadas da RdRp, a polimerase viral codificada pelo domínio da ORF1b, e foram utilizados para deteção de astrovírus em colónias de morcegos saudáveis, em Hong Kong tendo contribuído para o sucesso do estudo na medida em que revelaram uma prevalência e diversidade genética elevadíssimas dentro de uma mesma população.

No presente trabalho, os 3 resultados positivos a astrovírus foram conseguidos a partir dos *primers* descritos por este último autor, pela técnica de RTsn-PCR com uma temperatura de hibridação de 45°C. Assim, para a região conservada da RdRp, 3 amostras de um total de 19 (15.7%) resultaram em sequências que emparelharam com astrovírus. Estes resultados podem ser comparáveis aos descritos anteriormente na literatura em espécies de mamíferos marinhos, ainda que, como referido anteriormente as referências bibliográficas sejam limitadas. No estudo de Wellehan Jr (2010) 13 golfinhos-roazes mantidos sob cuidados humanos em *open waters*, de um total de 41 (32%) foram positivos a astrovírus (pela avaliação de sequências codificantes da RdRp) e apenas 6 dos mesmos 41 (15%) testaram positivos a partir da avaliação de sequências codificantes da proteína estrutural. No estudo de Li, Shan, e colaboradores (2011) os astrovírus foram os vírus mais prevalentes, presentes em 24 leões-

marinhos californianos de um total de 47 (51%), todos eles provenientes do estado selvagem da costa californiana, no Pacífico norte. Por oposição, o recente artigo de Kluge e colaboradores (2016) um estudo de metagenómica, com uma amostra total de 10 otárias sul-americanas arrojados no Brasil e cujos habitats naturais se encontram no Atlântico sul, identificou um total de 8 espécies virais de diferentes géneros e famílias, sem que no entanto, tenham sido detetadas sequências positivas a astrovírus. É assim interessante constatar a disparidade de informação com relação à deteção e prevalência de astrovírus em diferentes populações de mamíferos marinhos, selvagens e mantidas sob cuidados humanos.

Os baixos níveis de identidade aminoacídica (entre 31 e 51%) observados entre as sequências amplificadas neste trabalho e as sequências de astrovírus que emparelharam com maior similaridade, de entre todas as sequências anteriormente conhecidas no mundo e disponíveis para consulta no *Gen Bank* do NCBI, apontam para uma elevada diversidade genética dos astrovírus presentes nas 3 amostras positivas. Ainda assim, foi possível observar o padrão de conservação presente ao nível da proteína não-estrutural responsável pela replicação do genoma viral.

Também a árvore filogenética que resultou na análise filogenética das 3 novas sequências, foi construída para determinar a proximidade filogenética entre elas, e entre outras sequências de astrovírus. Foi possível observar-se que as 3 novas sequências formaram um agrupamento diferente, filogeneticamente bem suportado com um valor de *bootstrap* estatisticamente robusto (96%), pelo que se pode considerar válida essa avaliação. Destaca-se uma separação evolutiva entre este agrupamento e as sequências aminoacídicas das restantes duas espécies de astrovírus identificadas em pinípedes (astrovírus de leão-marinho californiano e astrovírus de leão-marinho-de-Steller) o que, apesar de, de certo modo ser inesperado uma vez que uma das amostras positivas (Z5) foi obtida a partir de um leão-marinho californiano, pode ser atribuído ao facto de se tratarem de populações de diferentes ambientes em distintas localizações geográficas.

No decorrer deste trabalho, apenas se conseguiram obter resultados positivos pela amplificação da polimerase viral dos astrovírus. Assim as avaliações acerca da proximidade filogenética destas 3 novas sequências não refletem os critérios de classificação atualmente em vigor. Isto porque:

1. a análise filogenética do género *Mamastrovirus* deve ser realizada com base na análise genética da sequência aminoacídica completa da ORF2;
2. as sequências aminoacídicas positivas neste estudo são compostas por apenas 127 a 132 aminoácidos, enquanto que o comprimento total da ORF1b das sequências aminoacídicas de astrovírus de leões-marinhos californianos, por exemplo, variam de 515-535 aminoácidos (Li, Shan, *et al.*, 2011), pelo que a análise bioinformática é limitada.

Ainda assim, referir que o próprio ICTV lista as sequências aminoacídicas parciais da ORF2 ou as sequências que codifiquem outros domínios dos astrovírus, como “*Related viruses which may be members of the Mamastrovirus genus but have not been approved as species*” (Bosch *et al.*, 2011).

De facto, existe um elevado número de sequências parciais da RdRp disponíveis *online*, mas relativamente poucas sequências da proteína estrutural e apenas 31 sequências de genoma de astrovírus completo, pertencendo a maioria a astrovírus humanos (8 sequências), seguidos de 6 sequências de bovinos, 4 de suínos domésticos, 2 de gatos, 2 de roedores, 5 de aves, 1 de dromedário, 1 de cão, 1 de coelho e 1 de javali (NCBI, 2016).

Dizer ainda que outros estudos referem a mesma limitação aos trabalhos, evidenciando as mesmas dificuldades na amplificação do genoma viral, reportando exclusivamente a amplificação da região da RdRp, a região do genoma mais conservada dos astrovírus (Finkbeiner, Kirkwood, *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2015). Estes autores sugerem que a baixa carga viral presente nas amostras ou a fraca qualidade das mesmas possa ser, um dos motivos para as dificuldades na amplificação/sequenciação.

Assim, do conjunto de todos estes resultados, a enunciar (i) as múltiplas metodologias de trabalho adotadas, com vários pares de *primers* desenhados a partir de sequências conhecidas ou já descritos na literatura, e cada um deles submetido a condições de amplificação variadas; (ii) os baixos níveis de identidade aminoacídica observados após os *BLASTx*; e (iii) a formação de um novo agrupamento filogenético com um valor de *bootstrap* estatisticamente robusto, vem dar ênfase ao facto da família *Astroviridae* constituir atualmente uma família emergente com notável diversidade genética, com uma longa história evolutiva e um amplo espectro de espécies hospedeiras. Faz ainda sugerir que as 3 sequências nucleotídicas amplificadas e que emparelham com o domínio da RdRp dos astrovírus possam corresponder a *novel* astrovírus presentes em três das quatro espécies de pinípedes analisadas.

De referir ainda que esta diversidade é tão mais significativa quanto menor a amostra, sendo que neste estudo a população total representa apenas 19 indivíduos. O mesmo tinha já sido descrito por Rivera *et al.* (2010) em que de uma amostra de 4 pinípedes, detetou 4 estirpes de astrovírus (CslAstV1-3 e SslAstV1), e em Li, Shan, *et al.*, (2011), que de uma amostra de 47 leões-marinhos californianos, conseguiu identificar mais 8 estirpes de astrovírus (CslAstV4-11).

Esta diversidade genética resulta possivelmente de processos de mutação e de recombinação genómica, muito comuns em vírus de genoma RNA de cadeia simples e sem envelope, que conduzem à rápida adaptação do vírus a novos nichos ecológicos e portanto, à infeção de novos hospedeiros (Moya, Holmes, & Gonzalez-Candelas, 2004; Pantin-Jackwood *et al.*, 2008). O mecanismo de recombinação mais comum entre estes vírus resulta da elevada

frequência de erros gerados pela RdRp, a RNA polimerase viral, que pode por sua vez induzir a mutações na sequência aminoacídica das proteínas estruturais responsáveis pela adsorção viral à célula hospedeira, justificando a maior variabilidade genética da ORF2, o gene codificante da proteína estrutural dos viriões (van Hemert, *et al.*, 2007).

Por este motivo, Meyer e colaboradores (2015) refere a necessidade de se determinar com maior exatidão o espectro de hospedeiros e a ecologia viral dos astrovírus, enquanto agente patogénico para a saúde humana, e de avaliar consequentemente, os mecanismos que conduzem à infeção por uma mesma estirpe de astrovírus de diferentes hospedeiros, bem como à infeção de múltiplas espécies de astrovírus num mesmo hospedeiro (Reuter, Pankovics, Delwart & Boros, 2012). Isto porque, as doenças emergentes estão frequentemente associadas a mudanças de hospedeiro, e graças aos dados científicos produzidos nos últimos seis anos, sugere-se a ocorrência de transmissão cruzada entre espécies e/ou a ocorrência de co-infeção do mesmo hospedeiro com diferentes astrovírus, favorecendo a emergência de novas estirpes virais (Atkins *et al.*, 2009; Mendenhall, Smith, *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2016).

Dos objetivos secundários deste trabalho, fazia parte a associação dos resultados obtidos com as variáveis espécie, sexo, idade, história clínica e distribuição temporal. Contudo, e não sendo possível a elaboração de uma correlação estatística válida a partir da baixa amostragem deste estudo, pode apenas interpretar-se os resultados obtidos de forma qualitativa.

Com relação às espécies animais, pode afirmar-se a presença de astrovírus nas amostras fecais de 3 das 4 espécies de pinípedes em estudo, designadamente leão-marinho californiano (*Zalophus californianus*), otária sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*) e foca comum (*Phoca vitulina*), sendo este o primeiro relato da identificação deste vírus nas últimas duas espécies citadas. A espécie foca-cinzenta (*Halichoerus grypus*), a única na qual não houve evidência da presença de astrovírus, encontrava-se sub-representada por apenas 1 indivíduo.

Todos os indivíduos positivos fazem parte do parque oceanográfico Zoomarine, e como referido anteriormente existe troca de espaços por diferentes grupos, que vão sendo variáveis em número e espécie. Por isso mesmo, e apesar da taxa de contacto entre eles ser provavelmente inferior ao que aconteceria na natureza, em que se formam colónias de pinípedes de grandes dimensões, principalmente nas épocas de reprodução, compreende-se que a manutenção e disseminação do vírus entre os diferentes animais seja transversal a todas as espécies.

Com relação à idade, em quase todas as espécies animais, os animais jovens estão normalmente mais associados a episódios clínicos por infeções a astrovírus. Em mamíferos marinhos não existem relatos de doença com efetiva associação à excreção do vírus, podendo apenas correlacionar-se a idade animal com a presença ou ausência do mesmo. No

estudo de Li *et al.*, (2011) o grupo quer das crias com menos de 3 meses, quer dos juvenis (entre os 2 e os 3 anos de idade) apresentaram prevalências inferiores quando comparados com o grupo dos leões-marinhos em reabilitação, o que segundo o autor pode ser explicado pelo fraco estado hígido destes hospedeiros. No presente estudo nenhum dos animais positivos a astrovírus corresponde à menor faixa etária (1-5 anos), sendo que no entanto, dos 19 animais em estudo apenas 1 (5%) corresponde a uma cria (com menos de 6 meses de idade), estando o grupo das crias sub-representado.

No que diz respeito à relação dos resultados com a presença ou não de sintomatologia, como descrito anteriormente, a otária sul-africana A3 e o leão-marinho californiano Z5, apresentavam-se saudáveis no momento da colheita, sem sintomatologia gastrointestinal ou outra, devendo apenas referir-se que o último animal se encontrava gestante. Na história clínica do indivíduo P3 surge de forma consistente a observação de fezes brandas, sendo este o único sinal clínico a reportar à data da colheita que resultou na sequência positiva a astrovírus. Interessante porém referir que o único animal das duas coleções zoológicas com evidente sintomatologia gastrointestinal (diarreia e regurgitação) no momento da colheita, tratava-se de um macho juvenil, e não foi positivo a nenhum dos vírus testados. Neste caso esporádico, pensa-se que outros agentes que não os três testados, virais ou bacterianos, possam estar envolvidos.

Apesar da ausência de associação entre a excreção de astrovírus nas fezes e a manifestação de sintomatologia gastrointestinal neste trabalho, e dadas as manifestações observadas noutras espécies animais, inclusive no homem, associadas ao género *Mamastrovirus* como descritas na revisão bibliográfica, é razoável colocar a hipótese de que estes vírus possam estar associados a processos autolimitantes, também em mamíferos marinhos. De notar que em todas as espécies hospedeiras do vírus conhecidas até à data, os casos assintomáticos são consideráveis, pelo que pode também acontecer, tal como descrito em humanos por Bosch e colaboradores (2014) que os pinípedes infetados por astrovírus possam eliminá-lo apenas após o desaparecimento dos sinais clínicos, funcionando ainda como reservatórios assintomáticos a excretar periodicamente o vírus.

Dado se saber agora da presença do agente em alguns animais da população do Zoomarine, pode apenas fazer-se o controlo do mesmo, particularmente a partir do controlo das vias de transmissão e da vigilância epidemiológica.

Com relação ao primeiro, poderá discutir-se a deteção e posterior inativação do vírus na água, nos alimentos e em fómites; contudo não existem ainda estudos suficientes que estabeleçam um limite de aceitabilidade ou de perigosidade a partir do qual o agente perca o seu poder infeccioso. De qualquer modo, o tratamento das águas com desinfetantes por um período de 2 horas, numa concentração de 1mg/mL de cloro livre mostrou ser efetivo (Abad *et al.*, 1997). Também a higiene pessoal e dos espaços comuns deve ser tida em grande consideração em ambiente zoológico, devendo as regras de biossegurança ser escrupulosamente cumpridas,

relativamente à limpeza e desinfecção de espaços, permanência do pessoal técnico e/ou dos animais em determinados espaços, o uso de pedilúvios, bem como regras de vestuário e calçado.

Com relação à vigilância epidemiológica, dever-se-á realizar um registo por um período prolongado de tempo adequado à monitorização do estado de saúde da população que permita detetar e avaliar temporalmente os processos clínicos, subclínicos ou assintomáticos, com o objetivo de facilitar a tomada de decisões em caso de surto. Como sugestão, seria interessante, sempre que possível, a colheita de amostras fecais dos pinípedes de ambas as coleções, na presença de sintomatologia gastrointestinal, como diarreia ou vômito/regurgitação, seguida de armazenamento a -20°C e posterior deteção viral em laboratório, incluindo-se assim os astrovírus na lista de diagnósticos diferenciais. Esta sugestão é tão válida para as coleções de pinípedes como para a coleção de golfinhos-roazes presentes no Zoomarine, uma vez que também estes espécimes sofrem frequentemente de alterações gastrointestinais e que se sabe serem hospedeiros dos astrovírus, tendo inclusivamente noutros estudos sido detetadas prevalências muito elevadas (Wellehan Jr, 2010).

Com relação aos sapovírus, os *primers* desenhados com base nas 2 sequências nucleotídicas de astrovírus de leão-marinho permitiram a amplificação de duas bandas que poderiam ser compatíveis com a sequência codificante do domínio da ORF2, contudo após sequenciação revelaram tratar-se de produtos inespecíficos.

Do mesmo modo, para os bocavírus, três pares de *primers* (dois deles complementares na técnica de snPCR) permitiram a amplificação de fragmentos que poderiam corresponder quer à sequência codificante da VP1, quer da NS1. Numa primeira abordagem escolheram-se *primers* que delimitam sequências do domínio da proteína estrutural, visto ser necessário para uma eventual posterior classificação no género *Bocavirus*, e posteriormente escolheram-se *primers* que delimitam sequências do domínio da proteína não-estrutural, dado esta região ser mais conservada. Ainda assim, nenhuma destas amplificações emparelharam com outras espécies de bocavírus após realização dos respetivos *BLAST*.

Estes resultados negativos podem ser justificados por algumas possibilidades, como:

1. Ausência de infeção viral, e consequente ausência de excreção viral, no momento da recolha das amostras;
2. Impossibilidade de deteção dos ácidos nucleicos virais por deterioração dos mesmos ou por falta de sensibilidade da técnica;
3. Variação nucleotídica das sequências virais.

No caso dos sapovírus, os *primers* utilizados deveriam permitir a amplificação das sequências esperadas de forma mais específica caso estivessem presentes nas alíquotas preparadas, pois tratavam-se de *primers* não degenerados. O mesmo acontece para os dois primeiros pares de *primers* para bocavírus utilizados na técnica de PCR. Em alternativa, não se

esperaria a obtenção de produtos de amplificação caso os genomas destes vírus não estivessem presentes nos extratos e/ou fossem geneticamente muito diferentes dos sapovírus e bocavírus descritos até agora, limitando a capacidade de hibridação dos *primers* utilizados. Assim sendo, a existência de outros animais positivos não pode ser descartada, principalmente se se considerar a elevada divergência genética dos vírus em estudo, como o que parece acontecer neste caso.

O conhecimento acerca da diversidade genética viral em mamíferos marinhos começou recentemente e rapidamente a expandir-se muito graças ao contributo do desenvolvimento das novas técnicas moleculares. Atualmente, é possível a análise do conteúdo genético independentemente de sistemas de culturas e/ou do conhecimento prévio de sequências virais e, com uma cobertura de deteção de novos vírus mais ampla (Ambrose & Clewley, 2006). Paralelamente, surgiram as metodologias de NGS (do inglês, *Next Generation Sequencing*) que foram como que uma revolução na análise metagenómica, e que têm permitido a descoberta de muitos vírus geneticamente divergentes ou de novos vírus anteriormente desconhecidos em várias espécies (Ng, Suedmeyer, Wheeler, Gulland, & Breitbart, 2009; Smits *et al.*, 2010), inclusivamente em mamíferos marinhos, bem como a sua caracterização genómica e filogenética. Isto porque permitem identificar várias sequências genómicas de forma rápida, precisa, pouco dispendiosa e com um elevado rendimento (Carapeta, 2015). Estas tecnologias baseiam-se na capacidade de detetar milhares de sequências raras ou minoritárias, uma vez que geram milhares de leituras a partir de uma única amostra. Representativamente, esta sequenciação é designada em inglês de *shotgun*, o que pode ser traduzido como “tiro de caçadeira” (Belák, Karlsson, Blomström, Berg, & Granberg, 2013; Mokili, Rohwer, & Dutilh, 2012) dando realmente a ideia do que sucede a nível molecular.

Contudo, o diagnóstico de infeções por *novel* vírus é ainda considerado difícil e ambicioso para a maioria das instituições de saúde e laboratórios, devido às limitações técnicas e financeiras.

Assim sendo e embora o desenvolvimento destas técnicas tenha contribuído para a identificação de diferentes vírus em mamíferos marinhos, as técnicas mais tradicionais não são substituídas na totalidade, pois continuam a ser utilizadas paralelamente, e de forma complementar, para a descoberta de novos vírus, como forma de definir o seu tropismo, a observação de efeito citopático, patogénese e mecanismos de replicação.

Apesar de os astrovírus humano serem vírus de difícil crescimento *in vitro* e dos *novel* astrovírus nunca terem sido cultivados em nenhuma linha celular, a combinação das técnicas moleculares juntamente com ensaios de infecciosidade, poderão auxiliar uma futura determinação do número de cópias infecciosas presentes no ambiente, água de bebida e comida, traduzindo-se numa melhoria da saúde pública.

No presente trabalho laboratorial recorreu-se às técnicas de PCR e RT-PCR convencionais, que graças às relações de complementaridade das bases azotadas, permitiram a amplificação de sequências raras numa mistura complexa de moléculas de ácidos nucleicos virais. Estas técnicas apresentam boa sensibilidade e especificidade, são rápidas e reprodutíveis. Para além disso, uma das etapas que se pensa ter sido significativa na deteção viral foi a filtração dos sobrenadantes num filtro de 0.45µm (Merck Millipore), capaz de reter bactérias e outros detritos celulares, permitindo a retenção dos viriões que pudessem estar presentes nas amostras. Esta técnica física de enriquecimento viral permitiu assim aumentar a probabilidade de deteção, pelo aumento do número de sequências virais, fundamental por exemplo na metagenómica (Hall *et al.*, 2014).

De facto, quando se trata de vírus pouco conhecidos ou muito divergentes, o seu diagnóstico e métodos utilizados constituem um desafio. Os custos necessários e o tempo de entrega de resultados devem ser fatores determinantes na escolha das técnicas e devem encorajar à competição benéfica entre metodologias mais recentes e as mais antigas.

De referir ainda que, de uma forma generalista, um diagnóstico atempado e preciso (pela identificação genotípica do vírus) é fundamental para otimizar o tratamento do doente, possibilitando assim a correta instituição de medicação antiviral (quando disponível), reduzindo o uso desnecessário de antibioterapia e os custos com outros testes diagnósticos desnecessários, e implementando medidas de contenção que evitem a transmissão do agente (Barzon *et al.*, 2014).

VI. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A realização da presente Dissertação de Mestrado resulta da realização de 2 estágios em parques oceanográficos e de 1 estágio laboratorial na FMV-ULisboa.

No decorrer dos dois primeiros, num total de seis meses em Portugal e um mês na Holanda, foi possível à autora ambientar-se com a prática clínica médico-veterinária num contexto zoológico, adquirir conhecimentos acerca da importância da conservação da natureza, e perceber o papel ímpar que as instituições zoológicas desempenham perante o público em geral, num despertar de mentalidades para a problemática ambiental, e perante as populações animais mantidas sob cuidados humanos, para posterior reabilitação ou não, ou presentes no estado selvagem, enquanto entidades responsáveis pela participação ativa na produção de conhecimento científico e sua disseminação com a comunidade científica e pela cooperação com governos e entidades locais na manutenção da biodiversidade global. Foi ainda possível compreender de que forma a atuação médico-veterinária é relevante neste contexto, não só pela responsabilidade na manutenção da saúde das populações, como também pela atuação multidisciplinar que é exigida perante a colocação em prática de conceitos como o planeamento nutricional, a biossegurança, os métodos de vigilância epidemiológica, o controlo de populações errantes e pragas, e a colaboração no apoio técnico às autoridades de saúde, tudo isto tendo em vista a máxima “*One world, one health*”.

Enquanto médico veterinário responsável por uma coleção de mamíferos marinhos, deve reconhecer-se a importância do ambiente que rodeia os indivíduos, nomeadamente das instalações, tendo em atenção as adaptações anatómicas, fisiológicas e comportamentais, que constitui um dos pilares da medicina preventiva destes animais. No fundo, o equilíbrio entre a tríade hospedeiro-agente-ambiente deve ser privilegiado e a situação vista como um todo. Compreender o mais possível, qual a influência dos sistemas de águas no favorecimento da multiplicação de determinados microrganismos, bem como perceber que os habitats artificiais estão mais propensos a originar algum tipo de pressão seletiva nesses mesmos microrganismos aquáticos, são funções que fazem parte desta consciência. A comunicação aberta e frequente com os treinadores, é também fundamental, uma vez que qualquer alteração do peso corporal, do comportamento, do apetite ou da atitude deve ser avaliado e ser tido em consideração.

Graças ao estágio nos laboratórios da FMV, num total de 3 meses, foi possível à autora o desenvolvimento técnico do tema proposto, sendo que apesar de todos os constrangimentos e limitações a que este género de projetos está inerente, foi possível realizar o primeiro relato da deteção de astrovírus em amostras fecais das espécies: foca comum (*Phoca vitulina*) e da subespécie otária sul-africana (*Arctocephalus pusillus pusillus*) a nível mundial.

Para além do mais, e do conhecimento da autora, este é o primeiro trabalho que rastreia vírus presentes em amostras fecais de toda uma coleção de pinípedes mantidos sob cuidados

humanos. As restantes descrições de casos de deteção de vírus fecais em pinípedes, abordadas na revisão bibliográfica do presente trabalho, remetem para estudos realizados a partir de animais em ambiente selvagem, arrojados ou não, presentes por períodos limitados de tempo em instalações para reabilitação e apenas 2 casos, de leões-marinhos californianos, são conhecidos pela comunidade científica, enquanto animais pertencente ao programa da marinha norte-americana, em que se detetou uma espécie de astrovírus, o CslAstV1 (Rivera *et al.*, 2010).

Sugere-se ainda que as 3 sequências nucleotídicas amplificadas e que emparelham com o domínio da RdRp dos astrovírus possam corresponder a *novel* astrovírus presentes em três das quatro espécies de pinípedes analisadas. Para confirmação destas suposições a autora pretende, a partir de novos *primers pan*-astrovírus, descritos no artigo de Atkins e colaboradores (2009), poder amplificar sequências codificantes da proteína da cápside, para assim validar as conclusões aqui discutidas. Deste modo seria possível aferir a real proximidade filogenética com as outras estirpes de astrovírus, inclusive com as espécies de astrovírus identificadas noutras espécies de mamíferos marinhos, determinando se o vírus detetado nestes 3 animais é ou não o mesmo que circula nos ambientes selvagens.

A autora espera ainda poder dar continuidade a este trabalho e testar as restantes amostras colhidas (2ª, 3ª e 4ª colheitas), averiguando assim a presença ou não de novos animais positivos, e avaliando se existe de facto uma continuidade na excreção viral de astrovírus ao longo do tempo, no caso dos animais positivos na 1ª colheita (A3, Z5 e P3). Esses resultados poderão abrir caminho em relação ao conhecimento que hoje se tem acerca dos astrovírus, uma vez que todas as referências bibliográficas de astrovírus detetados em mamíferos marinhos correspondem a colheitas únicas, desconhecendo-se se a excreção é resultado de infeções frequentes mas autolimitantes, ou de infeções menos frequentes mas com longos períodos de excreção. De notar que em ambiente selvagem as colheitas são difíceis de realizar, e que esta avaliação longitudinal poderá ter uma importância significativa e é possível graças ao treino animal realizado em ambientes zoológicos.

No futuro, seria ainda interessante desenvolver um *real-time* RT-PCR, uma metodologia com maior sensibilidade e que permitiria ao mesmo tempo a medição da carga viral.

Este trabalho permitiu o alargamento do espectro de hospedeiros capazes de serem infetados por astrovírus, o que deve ser considerado como uma mais-valia no conhecimento da ecologia destes vírus. Ficou ainda demonstrado que o viroma fecal /entérico dos pinípedes está ainda pouco caracterizado, ainda que se espere que o número de estudos deste género venham a ser cada vez mais frequentes graças às novas técnicas de sequenciação, aos planos de epidemiovigilância em estudo nos ambientes selvagens (Karlsson *et al.*, 2015) e ao grande número de pinípedes mantidos sob cuidados humanos em instituições zoológicas e centros de reabilitação.

É também do entender da autora que um maior conhecimento acerca do viroma presente em ambientes zoológicos, possibilita um impacto importante na gestão da saúde de mamíferos marinhos quer em ambiente selvagem (onde sofrem pressões de seleção cada vez mais elevadas), quer nas populações sob cuidados humanos, na medida em que esta mesma caracterização poderá ser comparada com outros rastreios virológicos para detetar ou monitorizar alterações na saúde destes indivíduos. Assim, a realização de estudos epidemiológicos sobre agentes virais em populações de mamíferos marinhos deve ser vista como uma ferramenta importante a adotar aquando da tomada de decisões no que diz respeito à conservação destes mesmos animais.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abad, F. X., Pinto, R. M., Villena, C., Gajardo, R., & Bosch, A. (1997). Astrovirus survival in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3119–3122.
- Abad, F. X., Villena, C., Guix, S., Caballero, S., Pinto, R. M., & Bosch, A. (2001). Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3904–3907.
- Abinanti, F., & Warfield, M. (1961). Recovery of a hemadsorbing virus (HADEN) from the gastrointestinal tract of calves. *Virology*, 14, 288–289.
- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., & Esteves, P. J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*, 43(1), 1–19.
- Allander, T. (2008). Human bocavirus. *Journal of Clinical Virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 41(1), 29–33.
- Allander, T., Tammi, M., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12891–12896.
- Ambrose, H. E., & Clewley, J. P. (2006). Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Reviews in Medical Virology*, 16(6), 365–383.
- Appleton, H., & Higgins, P. G. (1975). Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet (London, England)*, 1(7919), 1297.
- Arthur, J., Higgins, G., Davidson, G., Givney, R., Ratcliff, R. (2009). A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS pathogens*, 5(4), e1000391.
- Atkins, A., Wellehan, J. F. X., Childress, A. L., Archer, L. L., Fraser, W. A., & Citino, S. B. (2009). Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), 160–165.
- Baltimore, D. (1971). Expression of Animal Virus Genomes. *American Society for Microbiology*, 35(3), 235–241.
- Bank-Wolf, B. R., König, M., & Thiel, H. J. (2010). Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 204–212.
- Barry, A. F., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2008). High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. *Veterinary Microbiology*, 131(1–2), 185–191.
- Barzon, L., Squarzon, L., Pacenti, M., & Palú, G. (2014). Developments and Challenges in Diagnostic Virology. In S. Singh, *Viral Infections and Global Change* (pp. 259–260). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Bastien, N., Brandt, K., Dust, K., Ward, D., & Li, Y. (2006). Human Bocavirus Infection, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 848–850.
- Baxendale, W., & Mebatsion, T. (2004). The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 33(3), 364–370.
- Belák, S., Karlsson, O. E., Blomström, A. L., Berg, M., & Granberg, F. (2013). New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Veterinary Microbiology*, 165(1–2), 95–101.
- Binn, L., Lazar, E., Eddy, G., & Kajima, M. (1970). Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infection and Immunity*, 1(5), 503–508.
- Blacklow, N. R. (1996). Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In S. Baron (Ed.). Galveston (TX).
- Blessing, K., Neske, F., Herre, U., Kreth, H., & Weissbrich, B. (2009). Prolonged detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28 (11), 1018–1019.
- Blomström, A. L., Belák, S., Fossum, C., McKillen, J., Allan, G., Wallgren, P., Berg, M. (2009). Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced post weaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Research*, 146:125–129.
- Blomström, A. L., Widén, F., Hammer, A. S., Belák, S., & Berg, M. (2010). Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral

- metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4392–4396.
- Bodewes, R., Lapp, S., Hahn, K., Ko, M., Wohlsein, P., Fo, C., Baumga, ... Osterhaus, A. (2014). Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary Microbiology*, 174, 1-8.
- Bok, K., & Green, K. Y. (2012). Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. *New England Journal of Medicine*, 367(22), 2126–2132.
- Bonn, W. G. (2015). Pinnipedia. In R. E. Miller, & M. E. Fowler, *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol. 8, pp. 436-448). Elsevier.
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N., Méndez, E., Monroe, S., Pantin-Jackwood, M., SchultzCherry, S. (2011). *Astroviridae Study Group New Proposal*. ICTV. Obtido de <http://www.ictvonline.org/proposals/2010.018a-cV.A.v4.Mamastrovirus.pdf>.
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2014). Human astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 1048–1074.
- Bosch, A., Pintó, R. M., Villena, C., & Abad, F. X. (1997). Persistence of human astrovirus in fresh and marine water. *Water Science and Technology*, 35(11–12), 243 LP-247.
- Bossart, G. D. (2011). Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology*, 48(3), 676–690.
- Bouzalas, I. G., Wüthrich, D., Walland, J., Drögemüller, C., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., ... Seuberlich, T. (2014). Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3318–3324.
- Bridger, J. C. (1980). Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *The Veterinary Record*, 107(23), 532–533.
- Brieu, N., Gay, B., Segondy, M., & Foulongne, V. (2007). Electron Microscopy Observation of Human Bocavirus (HBoV) in Nasopharyngeal Samples from HBoV-Infected Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (10), 3419-3420.
- Brinker, P. J., Blacklow, R. N., & Herrmann, E. J. (2000). Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Archives of Virology*, 145(9), 1847–1856.
- Brown, J. R., Morfopoulou, S., Hubb, J., Emmett, W. A., Winnie, I., Shah, D., Brooks, ... Breuer, J. (2015). Astrovirus VA1/HMO-C: An increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*, 60(6), 881–888.
- Burbelo, P. D., Ching, K. H., Esper, F., Iadarola, M. J., Delwart, E., Lipkin, W. I., & Kapoor, A. (2011). Serological studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. *PLoS ONE*, 6(8), 1–5.
- Carapeta, S. S. C. (2015). *Identificação de Negevírus em mosquitos colhidos no Sul de Portugal e análise da sua replicação*. Universidade Nova de Lisboa.
- Carmichael, L. Schlafer, D., & Hashimoto, A. (1991). Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *The Cornell Veterinary*, 81(2), 151-171.
- Cattoli, G., Toffan, A., De Battisti, C., Salviato, A., Terregino, C., & Capua, I. (2005). Astroviruses found in the intestinal contents of guinea fowl suffering from enteritis. *The Veterinary Record*. Letter, England.
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J., & Green, K. Y. (2004). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8733–8738.
- Chanit, W., Thongprachum, A., Khamrin, P., Okitsu, S., Mizuguchi, M., & Ushijima, H. (2009). Intergenogroup recombinant sapovirus in Japan, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 15(7), 1084–1087.
- Chao, D.-Y., Wei, J.-Y., Chang, W.-F., Wang, J., & Wang, L.-C. (2012). Detection of multiple genotypes of calicivirus infection in asymptomatic swine in Taiwan. *Zoonoses and Public Health*, 59(6), 434–444.
- Chen, K., Shull, B., Moses, E., Lederman, M., Stout, E., Bates, R. (1986). Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *Journal of Virology*, 60(3), 1085-1097.
- Chen, X., Zhang, B., Yue, H., Wang, Y., Zhou, F., Zhang, Q., & Tang, C. (2015). A novel astrovirus species in the gut of yaks with diarrhoea in the Qinghai-Tibetan Plateau, 2013. *The Journal of General Virology*, 96(12), 3672–3680.

- Cheng, W., Li, J., Huang, C., Yao, D., Liu, N., Cui, S., ... Duan, Z. (2010). Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. *PLoS One*, 5(10), e13583.
- Chhabra, P., Payne, D. C., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Shirley, S. H., ... Vinjé, J. (2013). Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(5), 790–800.
- Chiba, S., Sakuma, Y., Kogasaka, R., Akihara, M., Horino, K., Nakao, T., & Fukui, S. (1979). An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *Journal of Medical Virology*, 4(4), 249–254.
- Choi, M., Park, S., Nguyen, V., Chung, H., Kim, A., Park, B. (2014). Molecular detection and genetic analysis of porcine bocavirus in Korean domestic swine herds. *Archives of Virology*, 159(6), 1487-1492.
- Choi, S., Lim, S.-I., Kim, Y. K., Cho, Y.-Y., Song, J.-Y., & An, D.-J. (2014). Phylogenetic Analysis of Astrovirus and Kobuvirus in Korean Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(8), 1141–1145.
- Chu, D. K., Chin, A. W., Smith, G. J., Chan, K. H., Guan, Y., Peiris, J. S., Poon, L. L. (2010). Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *Journal of General Virology*, 91:2457–62.
- Chu, D. K., Poon, L.L., Guan, Y., Peiris, J.S. (2008). Novel astroviruses in insectivorous bats. *Journal of Virology*, 82 (18), 9107–9114
- Chu, D., Leung, C., Perera, H., Ng, E., Gilbert, M., Joyner, P., ... Poon, L. (2012). A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 86(24), 13772–13778.
- Clarke, I., Knowles, N., Studdert, M., & Vinjé, J. (2012). *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (A. King, M. Adams, E. Carstens, & E. Lefkowitz, Eds.), *International Union of Microbiological Societies - Virology Division*. Elsevier.
- Colitz, C. M. H., Renner, M. S., Manire, C. A., Doescher, B., Schmitt, T. L., Osborn, S. D., ... Rudnick, J. C. (2010). Characterization of progressive keratitis in Otariids. *Veterinary Ophthalmology*, 13 (SUPPL. 1).
- Confalonieri, U. E. (2014). Mudanças Climáticas Globais, Saúde e Ecossistemas. In Z. S. Cubas, J. C. Silva, & J. L. Catão-Dias, *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária* (2 ed., Vol. 2, pp. 2322-2326). São Paulo: Editora Roca.
- Cordey, S., Vu, D. L., Schibler, M., L'Huillier, A. G., Brito, F., Docquier, M., ... Kaiser, L. (2016). Astrovirus MLB2, a new gastroenteric virus associated with meningitis and disseminated infection. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 846–853.
- Coria-Galindo, E., Rangel-Huerta, E., Verdugo-Rodríguez, A., Brousset, D., Salazar, S., & Padilla-Noriega, L. (2009). Rotavirus infections in Galapagos sea lions. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 722–728.
- Cotmore, S., McKenna, M., Chiorini, J., Gatherer, D., Mukha, D., Pintel, D., Qiu, ... Tijssen, P. (2013). Rationalization and extension of the taxonomy of the family Parvoviridae. ICTV. Obtido de <http://www.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf>.
- Cotmore, S., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J., Mukha, D., Pintel, D., Qiu, J., ... Davison, A. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 159(5), 1239-1247.
- Cowley, D., Donato, C., & Kirkwood, C. (2014). Emerging Trend of Astroviruses, Enteric Adenoviruses, and Rotaviruses in Human Viral Gastroenteritis. In S. Singh (Ed.), *Viral Infections and Global change* (pp. 495–508).
- Cubitt, W. D., & Barrett, A. D. T. (1984). Propagation of Human Candidate Calicivirus in Cell Culture. *Journal of General Virology*, 65(6), 1123–1126.
- Cubitt, W. D., & McSwiggan, D. A. (1981). Calicivirus gastroenteritis in North West London. *The Lancet*, 318(8253), 975–977.
- Cubitt, W. D., & McSwiggan, D. A. (1987). Seroepidemiological survey of the prevalence of antibodies to a strain of human calicivirus. *Journal of Medical Virology*, 21(4), 361–368.
- Cubitt, W. D., McSwiggan, D. A., & Arstall, S. (1980). An outbreak of calicivirus infection in a mother and baby unit. *Journal of Clinical Pathology*, 33(11), 1095–1098.
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., & Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies

- transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1529–1544.
- Decaro, N., Amorisco, F., Lenoci, D., Lovero, A., Colaianni, M., Losurdo, M., ... Buonavoglia, C. (2012). Molecular characterization of Canine minute virus associated with neonatal mortality in a litter of Jack Russel terrier dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(4), 755–758.
- Decreto-Lei nº 263/81 de 3 de Setembro. *Diário de República nº 202/81*. Ministério da Qualidade de Vida - Secretaria de Estado do Ordenamento e Ambiente. Lisboa.
- del Rocío Banos-Lara, M., & Méndez, E. (2010). Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology*, 401(2), 322–332.
- Dey, S. K., Phathamavong, O., Nguyen, T. D., Thongprachum, A., Chan-It, W., Okitsu, S., ... Ushijima, H. (2011). Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003–2009. *Epidemiology and Infection*, 140(1), 74–77.
- Dierauf, L. A., Lowenstine, L. J., & Jerome, C. (1981). Viral hepatitis (adenovirus) in a California sea lion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(11), 1194–1197.
- Donelli, G., Superti, F., Tinari, A., & Marziano, M. L. (1992). Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *Journal of Medical Virology*, 38(4), 271–277.
- Drexler, J. F., Corman, V. M., Wegner, T., Tateno, A. F., Zerbini, R. M., Gloza-Rausch, F., ... Drosten, C. (2011). Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 449–456.
- Dudleam, E., Lin, C., Dredge, D., Murray, B., Robinson, R., Johnson, F. (2010). Bovine parvovirus uses clathrin-mediated endocytosis for cell entry. *Journal of General Virology*, 91(12), 3032–3041.
- Duffy, S., Shackleton, L., & Holmes, E. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics*, 9(4), 267–276.
- Englund, L., Chriel, M., Dietz, H. H., & Hedlund, K. O. (2002). Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Veterinary Microbiology*, 85(1), 1–11.
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., & Arias, C. F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42(10–11), 2618–2628.
- European Association of Zoos and Aquaria (2016). EAZA Code of Ethics. Obtido de <http://www.eaza.net/assets/Uploads/Standards-and-policies/EAZA-Code-of-Ethics-2015.pdf>
- Farkas, T., Deng, X., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A., & Jiang, X. (2006). Development of an Enzyme Immunoassay for Detection of Sapovirus-Specific Antibodies and Its Application in a Study of Seroprevalence in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3674–3679.
- Farkas, T., Fey, B., Keller, G., Martella, V., & Egyed, L. (2012). Molecular detection of novel astroviruses in wild and laboratory mice. *Virus Genes*, 45(3), 518–525.
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., & Jiang, X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of *Caliciviridae*. *Journal of Virology*, 82(11), 5408–16.
- Farkas, T., Zhong, M. W., Jing, Y., Huang, W. P., Espinosa, M. S., Martinez, N., ... Jiang, X. (2004). Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology*, 149(7), 1309–1323.
- Finianos, M., Issa, R., Curran, M., Afif, C., Rajab, M., Irani, J., ... Chaar, M. (2016). Etiology, Seasonality, and Clinical Characterization of Viral Respiratory Infections Among Hospitalized Children in Beirut, Lebanon. *Journal of Medical Virology*, 88(April), 1874–1881.
- Finkbeiner, S., Allred, A., Tarr, P., Klein, E., Kirkwood, C., & Wang, D. (2008). Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. *PLoS Pathog*, 4.
- Finkbeiner, S., Holtz, L., Jiang, Y., Rajendran, P., Franz, C., Zhao, G., ... Wang, D. (2009). Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal*, 6, 161.
- Finkbeiner, S., Kirkwood, C., & Wang, D. (2008). Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology*, 5.
- Finkbeiner, S., Li, Y., Ruone, S., Conrady, C., Gregoricus, N., Toney, D., ... Tong, S. (2009). Identification of a novel astrovirus (Astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute

gastroenteritis. misc.

- Gallimore, C. I., Pipkin, C., Shrimpton, H., Green, A. D., Pickford, Y., McCartney, C., ... Gray, J. J. (2004). Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiology and Infection*, 133(1), 41–47.
- Gallimore, C. I., Taylor, C., Gennery, A. R., Cant, A. J., Galloway, A., Lewis, D., & Gray, J. J. (2005). Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3890–3894.
- GIDEON Informatics, I., & Berger, S. (2016). *Viral Gastroenteritis: Global Status: 2016 Edition*. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=tKmkCwAAQBAJ>
- Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.-M., & Zmirou, D. (2016). Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *Journal of Clinical Virology*, 27(1), 74–82.
- Gou, D., Wang, Z., Yao, S., Li, C., Geng, Y., Wang, E., ... Sun, D. (2016). Epidemiological investigation reveals genetic diversity and high co-infection rate of canine bocavirus strains circulating in Heilongjiang province, Northeast China.
- Guo, M., Evermann, J. F., & Saif, L. J. (2001). Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Archives of Virology*, 146(3), 479–493.
- Gough, R. E., Collins, M. S., Borland, E., & Keymer, L. F. (1984). Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *The Veterinary Record*. Letter, ENGLAND.
- Gray, E. W., Angus, K. W., & Snodgrass, D. R. (1980). Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *The Journal of General Virology*, 49(1), 71–82.
- Grellet, A., Battisti, C. De, Feugier, A., Pantile, M., Marciano, S., Grandjean, D., & Cattoli, G. (2012). Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels. *Veterinary Microbiology*, 157(1–2), 214–219.
- Guix, S., Bosch, A., Ribes, E., Martínez, L. D., & Pintó, R. M. (2004). Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology*, 319(2), 249–261.
- Guix, S., Caballero, S., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2004). C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *Journal of Virology*, 78(24), 13627–13636.
- Gulland, F., Pérez-Cortés, H., Urbán, J. R., Rojas-Bracho, L., Ylitalo, G., Weir, ... Rowles, T. (2005). *Eastern North Pacific gray whale (Eschrichtius robustus) unusual mortality event, 1999-2000. U.S. Department of Commerce. NOAA Technical Memorandum. NMFS-AFSC-150*. Obtido de <http://www.afsc.noaa.gov/publications/AFSC-TM/NOAA-TM-AFSC-150.pdf>
- Gurda, B., Parent, K., Bladek, H., Sinkovits, R., Dimattia, M., Rence, C., ... Agbandje-Mckenna, M. (2010). Human Bocavirus Capsid Structure: Insights into the Structural Repertoire of the Parvoviridae. *Journal of Virology*, 84(12), 5880–5889.
- Guy, J. S., Miles, A. M., Smith, L., Fuller, F. J., & Schultz-Cherry, S. (2004). Antigenic and genomic characterization of turkey enterovirus-like virus (North Carolina, 1988 isolate): identification of the virus as turkey astrovirus 2. *Avian Diseases*, 48(1), 206–211. *Research in Veterinary Science*, 106, 7–13.
- Haff, L. A. (1994). Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods and Applications*, 3(6), 332–337.
- Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., ... Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of Virological Methods*, 195, 194–204.
- Hammer, A., K.Ullman, Jensen, T., Hedlund, K., Czifra, G., Dietz, H., & Baule, C. (2012). Preliminary results of field and experimental investigations of pre-weaning diarrhea in mink. *Proceedings of the Xth International Scientific Congress in fur animal production*, 1, pp. 146–152. Wageningen Academic Publishers. Obtido de <http://www.springer.com/la/book/9789086867608>
- Hansman, G. S., Oka, T., Sakon, N., & Takeda, N. (2007). Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. *Emerging Infectious Disease Journal*, 13(10), 1519.
- Hansman, G. S., Saito, H., Shibata, C., Ishizuka, S., Oseto, M., Oka, T., & Takeda, N. (2007).

- Outbreak of Gastroenteritis Due to Sapovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1347–1349.
- Hansman, S. G., Guntapong, R., Pongsuwanna, Y., Natori, K., Katayama, K., & Takeda, N. (2006). Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Archives of Virology*, 151(3), 551–561.
- Herrmann, J., Taylor, D., Echeverri, P., & Blacklow, N. (1991). Astroviruses as a Cause of Gastroenteritis in Children. *New England Journal of Medicine*, 324(25), 1757–1760.
- Hoelzer, K., Shackelton, L., Parrish, C. & Holmes, E. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *Journal of General Virology*, 89(9), 2280–2289.
- Holtz, L. R., Bauer, I. K., Jiang, H., Belshe, R., Freiden, P., Schultz-Cherry, S. L., & Wang, D. (2014). Seroepidemiology of astrovirus MLB1. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(6), 908–911.
- Holtz, L. R., Wylie, K. M., Sodergren, E., Jiang, Y., Franz, C. J., Weinstock, G. M., ... Wang, D. (2011). Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. *Emerging Infectious Diseases*, 17(11), 2050–2.
- Honkavuori, K. S., Briese, T., Krauss, S., Sanchez, M. D., Jain, K., Hutchison, ... Lipkin, W. I. (2014). Novel Coronavirus and Astrovirus in Delaware Bay Shorebirds. *PLoS ONE*, 9(4), e93395.
- Horak, S., Killoran, K., & Larson, K. (2016). *Vesicular exanthema of swine virus*. *Swine Health Information Center and Center for Food Security and Public Health*. Obtido de <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-vesicular-exanthema-swine-virus>
- Hoshino, Y., Zimmer, J. F., Moise, N. S., & Scott, F. W. (1981). Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. Brief report. *Archives of Virology*, 70(4), 373–376.
- Hu, B., Chmura, A. A., Li, J., Zhu, G., Desmond, J. S., Zhang, Y., ... Shi, Z. (2014). Detection of diverse novel astroviruses from small mammals in China. *Journal of General Virology*, 95(2014), 2442–2449.
- Huhulescu, S., Kiss, R., Brettlecker, M., Cerny, R. J., Hess, C., Wewalka, G., & Allerberger, F. (2008). Etiology of Acute Gastroenteritis in Three Sentinel General Practices, Austria 2007. *Infection*, 37(2), 103–108.
- ICTV. Virus Taxonomy: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). Editors. King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- ICTV. (2015). *ICTV 9th Report (2011)*. Retrieved Setembro 20, 2016, from International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - Collaboration, Information, Files, and Discussion: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- Imada, T., Yamaguchi, S., Mase, M., Tsukamoto, K., Kubo, M., & Morooka, A. (2000). Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family *Astroviridae* and construction of infectious ANV cDNA. *Journal of Virology*, 74(18), 8487–8493.
- Iserte, J. A., Stephan, B. I., Goñi, S. E., Borio, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2013). Family-Specific Degenerate Primer Design: A Tool to Design Consensus Degenerated Oligonucleotides. *Biotechnology Research International*.
- IUCN (2014). Guidelines on the Use of Ex Situ Management for Species Conservation, 1–15.
- IUPAC-IUB. (1970). Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents. *European Journal of Biochemistry*, 15(2), 203–208.
- Iwakiri, A., Ganmyo, H., Yamamoto, S., Otao, K., Mikasa, M., Kizoe, S., ... Oka, T. (2009). Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Archives of Virology*, 154(4), 689–693.
- Jartti, T., Hedman, K., Jartti, L., Ruuskanen, O., Allander, T., Söderlund-Venemo, M. (2012). Human bocavirus - The first 5 years. *Reviews in Medical Virology*, 22(January), 46–64.
- Jeong, H. S., Jeong, A., & Cheon, D. S. (2012). Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean Journal of Pediatrics*, 55(3), 77–82.
- Jiang, H., Holtz, L. R., Bauer, I., Franz, C. J., Zhao, G., Bodhidatta, ... Wang, D. (2013). Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology*, 436(1), 8–14.
- Jiang, Y., Xiao, C., Yin, S., Gerber, P., Halbur, P., Opriessnig, T. (2014). High prevalence and

- genetic diversity of porcine bocaviruses in pigs in the USA, and identification of multiple novel porcine bocaviruses. *Journal of General Virology*, 95, 453-465.
- Johansson, P. J. H., Bergentoft, K., Larsson, P. A., Magnusson, G., Widell, A., Thorhagen, M., & Hedlund, K.-O. (2005). A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37(3), 200–204.
- Kaplon, J., Guenau, E., Asdrubal, P., Pothier, P., & Ambert-Balay, K. (2011). Possible novel nebovirus genotype in cattle, France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1120–1123.
- Kapoor, A., Horning, M., Asokan, A., Williams, B., Henriquez, J., Lipkin, W. (2011). Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PloS One*, 6(6), e21362
- Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., Zaidi, S. Z., Delwart, E. (2009). Multiple novel astrovirus species in human stool. *Journal of General Virology*, 90(12), 2965–2972.
- Kapoor, A., Mehta, N., Dubovi, E., Simmonds, P., Govindasamy, L., Medina, J., ... Lipkin, W. (2012). Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. *Journal of General Virology*, 93(2), 341-346.
- Kapoor, A., Mehta, N., Esper, F., Poljsak-Prijatelj, M., Quan, p., Qaisar, N., ... Lipkin, W. (2010). Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS ONE* 5(7): e11948.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Slikas, B., Li, L., Bodhidatta, L. Sethabutr, O., ... Bartkus, J. (2010) Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent enteric infections. *Journal of Infectious Diseases*, 201(11), 1633-1643.
- Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naeem, A., ... Delwart, E. (2009). A Newly Identified Bocavirus Species in Human Stool. *Journal of Infectious Diseases*, 199:196–200.
- Karlsson, E. A., Small, C. T., Freiden, P., Feeroz, M. M., Matsen, F. A., San, S., ... Schultz-Cherry, S. (2015). Non-Human Primates Harbor Diverse Mammalian and Avian Astroviruses Including Those Associated with Human Infections. *PLoS Pathogens*, 11(11), 1–17.
- Khamrin, P., Dey, S. K., Chan-it, W., Thongprachum, A., Satou, K., Okitsu, S., ... Ushijima, H. (2010). Evaluation of a Rapid Immunochromatography Strip Test for Detection of Astrovirus in Stool Specimens. *Journal of Tropical Pediatrics*, 56(2), 129–131.
- Kjeldsberg, E., & Hem, A. (1985). Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. Brief report. *Archives of Virology*, 84(1–2), 135–140.
- Kluge, M., Campos, F. S., Tavares, M., de Amorim, D. B., Valdez, F. P., Giongo, A., ... Franco, A. C. (2016). Metagenomic Survey of Viral Diversity Obtained from Feces of Subantarctic and South American Fur Seals. *PloS One*, 11(3), e0151921.
- Kobayashi, S., Fujiwara, N., Yasui, Y., Yamashita, T., Hiramatsu, R., & Minagawa, H. (2012). A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Archives of Virology*, 157(10), 1995–1997.
- Koci, M. D., Moser, L. a, Kelley, L. a, Larsen, D., Brown, C. C., & Schultz-Cherry, S. (2003). Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflammation and Cell Death. *Journal of Virology*, 77(21), 11798–11808.
- Koci, M. D., & Schultz-Cherry, S. (2002). Avian astroviruses. *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A.*, 31(3), 213–227.
- Kurtz, J. B., Lee, T. W. (1978). Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody infection in volunteers. *Journal of Medical Microbiology and Immunology*, 166(1), 227-230.
- Kurtz, J. B., & Lee, T. W. (1987). Astroviruses: human and animal. *Ciba Foundation Symposium*, 128, 92–107. Journal Article.
- Kurtz, J. B., Lee, T. W., Craig, J. W., & Reed, S. E. (1979). Astrovirus infection in volunteers. *Journal of Medical Virology*, 3(3), 221–230.
- Lau, S., Woo, P., Yeung, H., Teng, J., Wu, Y., Bai, R., ... Yuen, K. (2012). Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus. *Journal of General Virology*, 93(7), 1573-1582.
- Lau, S. Woo, P., Yip, C., Li, K., Fu, C., Huang, Y. ... Yuen, K. (2011). Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family Parvoviridae, and evidence for inter- and intra-host genetic diversity and recombination. *Journal of General Virology*, 92(9), 2047-2059.

- L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, É., Lamontagne, A.-M., Ouardani, M., Lacroix, G., & Simard, C. (2009). Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of *Caliciviridae*. *Virus Genes*, 39(1), 66–75.
- Lee, L. E., Cebelinski, E. A., Fuller, C., Keene, W. E., Smith, K., Vinjé, J., & Besser, J. M. (2012). Sapovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerging Infectious Disease Journal*, 18(5), 873.
- Lee, J., Chung, J., Han, T., Song, M., & Hwang, E. (2007). Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 196(7), 994–997.
- Lee, R. M., Lessler, J., Lee, R. A., Rudolph, K. E., Reich, N. G., Perl, T. M., & Cummings, D. A. T. (2013). Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 13, 446.
- Lewis, T. L., & Matsui, S. M. (1997). Studies of the Astrovirus Signal That Induces (–1) Ribosomal Frameshifting. In P. S. Paul, D. H. Francis, & D. A. Benfield (Eds.), *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases* (pp. 323–330).
- Li, B., Ma, J., Xiao, S., Fang, L., Zeng, S., Wen, L., ... He, K. (2012). Complete Genome Sequence of a Novel Species of Porcine Bocavirus, PBoV5. *Journal of Virology*, 86: 1286–1287.
- Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C. M., Marks, S. L., Kubiski, S., ... Pesavento, P. A.. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 534–541.
- Li, L., Pesavento, P. A., Shan, T., Leutenegger, C. M., Wang, C., & Delwart, E. (2011). Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 11), 2534–2541.
- Li, L., Shan, T., Wang, C., Côté, C., Kolman, J., Onions, D., ... Delwart, E. (2011). The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. *Journal of Virology*, 85(19), 9909–9917.
- Liao, Q., Liu, N., Wang, X., Wang, F., & Zhang, D. (2015). Genetic characterization of a novel astrovirus in Pekin ducks. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 32, 60–67.
- Liu, Q., Zhang, Z., Zheng, Z., Zheng, C., Liu, Y., Hu, Q., ... Wang, H. (2016). Human Bocavirus NS1 and NS1-70 Proteins Inhibit TNF- α -Mediated Activation of NF- κ B by targeting p65. *Scientific Reports*, 6, 28481.
- Liu, B. L., Clarke, I. N., Caul, E. O., & Lambden, P. R. (1995). Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*, 140(8), 1345–1356.
- Liu, J., Kibiki, G., Maro, V., Maro, A., Kumburub, H., Swai, N., ... Swaib, Mami Taniuchia, Jean Gratza, Denise Toneyc, Gagandeep Kangd, and E. H. (2011). *Multiplex Reverse Transcription PCR Luminex Assay for Detection and Quantitation of Viral Agents of Gastroenteritis. Clin Virolo*, 50(4), 308–313.
- Liu, M., Li, Y., Sun, D., Xia, Y., Huang, J., Guo, L. (2014). Detection and genetic analysis of porcine bocavirus in different swine herds in North Central China. *The Scientific World Journal*, 2014, 947084.
- Liu, Y., Xu, Z. Q., Zhang, Q., Jin, M., Yu, J. M., Li, J. S., ... Duan, Z. J. (2012). Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed luminex-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2384–2389.
- Lopes-João, A., Costa, I., Mesquita, J. R., Oleastro, M., Penha-Gonçalves, C., & Nascimento, M. S. J. (2015). Multiple enteropathogenic viruses in a gastroenteritis outbreak in a military exercise of the Portuguese Army. *Journal of Clinical Virology*, 68, 73–75.
- Lukashov, V. V., & Goudsmit, J. (2002). Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 6), 1397–1405.
- Luo, Z., Roi, S., Dastor, M., Gallice, E., Laurin, M.-A., & L'homme, Y. (2011). Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 149(3–4), 316–323.
- Madeley, C. R. (1979). Comparison of the Features of Astroviruses and Caliciviruses Seen in Samples of Feces by Electron Microscopy. *Journal of Infectious Diseases*, 139(5), 519–523.
- Madeley, C. R., & Cosgrove, B. P. (1975). Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet (London, England)*, volume 2.

- Madeley, C. R., & Cosgrove, B. P. (1976). Caliciviruses in man. *The Lancet*, 307(7952), 199–200.
- Major, M. E., Eglin, R. P., & Easton, A. J. (1992). 3' Terminal nucleotide sequence of human astrovirus type 1 and routine detection of astrovirus nucleic acid and antigens. *Journal of Virological Methods*, 39(1), 217–225.
- Marczinke, B., Bloys, A. J., Brown, T. D., Willcocks, M. M., Carter, M. J., & Brierley, I. (1994, September). The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *Journal of Virology*, 68(9), 5588-5595.
- Marshall, J. A., Kennett, M. L., Rodger, S. M., Studdert, M. J., Thompson, W. L., & Gust, I. D. (1987). Virus and virus-like particles in the faeces of cats with and without diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*, 64(4), 100–105.
- Martin, E., Fairchok, M., Kuypers, J., Magaret, A., Zerr, D., Wald, A., Englund, J. (2010). Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *Journal of Infectious Diseases*, 201(11), 1625-1632.
- Martella, V., Moschidou, P., Lorusso, E., Mari, V., Camero, M., Bellacicco, A., ... Buonavoglia, C. (2011). Detection and characterization of canine astroviruses. *Journal of General Virology*, 92(8), 1880–1887.
- Martella, V., Moschidou, P., Pinto, P., Catella, C., Desario, C., Larocca, V., ... Buonavoglia, C. (2011). Astroviruses in Rabbits. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2287-2293.
- Marvulo, M. F., & Carvalho, V. M. (2014). Zoonoses. In Z. S. Cubas, J. C. Silva, & J. L. Catão-Dias, *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária* (2ª ed., Vol. 2, pp. 2194-2205). São Paulo: Editora Roca.
- Matson, D. O., Estes, M. K., Tanaka, T., Bartlett, A. V, & Pickering, L. K. (1990). Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9(3), 190–196.
- Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C. H., & Ponka, A. (2004). Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiology and Infection*, 132(4), 737–743.
- Mayo, A. M. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 147(8), 1655–1656.
- McKillen, J., McNeilly, F., Duffy, C., McMenamy, M., McNar, I., Hjertner, B., ... Allan, G. (2011) Isolation in cell cultures and initial characterisation of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 152(1-2), 39-45.
- McIntosh, K. (2006). Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *Journal of Infectious Diseases*, 194(9), 1197-1199.
- McNulty, M. S., Curran, W. L., & McFerran, J. B. (1980). Detection of astroviruses in turkey faeces by direct electron microscopy. *The Veterinary Record*, 106(26), 561.
- Mcswiggan, D. A., Cubitt, D., & Moore, W. (1978). Calicivirus associated with Winter Vomiting Disease. *The Lancet*, 311(8075), 1215.
- Mendenhall, I. H., Smith, G. J. D., & Vijaykrishna, D. (2015). Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study. *Journal of Virology*, 89(14), 6978–6981.
- Mendenhall, I. H., Yaung, K. N., Joyner, P. H., Keatts, L., Borthwick, S., Neves, E. S., ... Smith, G. J. (2015). Detection of a novel astrovirus from a black-naped monarch (*Hypothymis azurea*) in Cambodia. *Virology Journal*, 12, 182.
- Méndez, E., Arias, C. F. Astrovirus. In: Knipe, D. M., Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5. Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: 2007. pp. 981–1000.
- Méndez, E., Fernández-Luna, T., López, S., Méndez-Toss, M., & Arias, C. F. (2002). Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *Journal of Virology*, 76(16), 7996–8002.
- Méndez, E., Muñoz-Yañez, C., Sánchez-San Martín, C., Aguirre-Crespo, G., Baños-Lara, M. del R., Gutierrez, M., ... López, S. (2014). Characterization of Human Astrovirus Cell Entry. *Journal of Virology*, 88(5), 2452–2460.
- Méndez, E., Salas-Ocampo, E., & Arias, C. F. (2004). Caspases Mediate Processing of the Capsid Precursor and Cell Release of Human Astroviruses. *Journal of Virology*, 78(16), 8601–8608.
- Meyer, C. T., Bauer, I. K., Antonio, M., Adeyemi, M., Saha, D., Oundo, J. O., ... Holtz, L. R. (2015). Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and The

- Gambia. *Virology Journal*, 12(1), 78.
- Mikula, C., Springer, B., Reichart, S., Bierbacher, K., Lichtenschopf, A., & Hoehne, M. (2010). Sapovirus in Adults in Rehabilitation Center, Upper Austria. *Emerging Infectious Disease Journal*, 16(7), 1186.
- Mitchell, D. K., Monroe, S. S., Jiang, X., Matson, D. O., Glass, R. I., & Pickering, L. K. (1995). Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1437–1444.
- Mittelholzer, C., Englund, L., Hedlund, K.-O., Dietz, H.-H., & Svensson, L. (2003). Detection and sequence analysis of Danish and Swedish strains of mink astrovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5192–5194.
- Mokili, J. L., Rohwer, F., & Dutilh, B. E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 63–77.
- Moschidou, P., Martella, V., Lorusso, E., Desario, C., Pinto, P., Losurdo, M., ... Buonavoglia, C. (2011). Mixed infection by Feline astrovirus and Feline panleukopenia virus in a domestic cat with gastroenteritis and panleukopenia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3), 581–4.
- Moser, L. A., Carter, M., & Schultz-Cherry, S. (2007). Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *Journal of Virology*, 81(21), 11937–11945.
- Moser, L. A., & Schultz-Cherry, S. (2005). Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunology*, 18(1), 4–10.
- Moya, A., Holmes, E. C., & Gonzalez-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(4), 279–288.
- Murphy, F. A. (1995). *Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Viena, Áustria: Springer-Verlag. Obtido de <http://www.ictvonline.org/proposals/ICTV%206th%20Report.pdf> em 17.08.2016.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Medical Microbiology* (6ª ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Naccache S. N., Peggs K. S., Mattes F. M., Phadke, R., Garson, J. A., Grant, P., ... Chiu, C. Y. (2015) Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 60:919–923.
- Naing, Z., Rayner, B., Killikulangara, A., Vunnam, K., Leach, S., McIver, C. J., ... Rawlinson, W. D. (2013). Prevalence of viruses in stool of premature neonates at a neonatal intensive care unit. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49(3), E221–E226.
- Nakamura, K., Saga, Y., Iwai, M., Obara, M., Horimoto, E., Hasegawa, S., ... Takizawa, T. (2010). Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine sapovirus in Japan during fiscal year 2008. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1215–1222.
- Nakata, S., Estes, M. K., & Chiba, S. (1988). Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(10), 2001–2005.
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K., Kogawa, K., Ukae, S., Adachi, N., ... Chiba, S. (1998). Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3160–3163.
- NCBI. (2016). (U. N. Medicine, Producer) Retrieved 08 17, 2016, from National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=astrovirus>
- Neto, M., Siveira, M., Santos, M. E. (2016). Training Bottlenose Dolphins to Overcome Avoidance of Environmental Enrichment Objects in Order to Stimulate Play Activities. *Zoo Biology*, 9999: 1-6.
- Ng, T. F. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., ... Delwart, E. (2012). High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *Journal of Virology*, 86(22), 12161–12175.
- Ng, T. F. F., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S. J., Kondov, N. O., Wong, W., Reuter, G., ... Delwart, E. (2014). Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Veterinary Microbiology*, 171(1–2), 102–111.

- Ng, T., Suedmeyer, W., Wheeler, E., Gulland, F., & Breitbart, M. (2009). Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *Journal of General Virology*, 90(5), 1256-1261.
- Nighot, P. K., Moeser, A., Ali, R. A., Blikslager, A. T., & Koci, M. D. (2010). Astrovirus infection induces sodium malabsorption and redistributes sodium hydrogen exchanger expression. *Virology*, 401(2), 146–154.
- Nix, W. A., Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006, August). Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Norja, P., Hedman, L., Kantola, K., Kempainen, K., Suvilehto, J., Pitkaranta, A., ... Soderlund-Venermo, M. (2012). Occurrence of human bocaviruses and parvovirus 4 in solid tissues. *Journal of Medical Virology*, 84(8), 1267-1273.
- Numata, K., Hardy, M. E., Nakata, S., Chiba, S., & Estes, M. K. (1997). Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Archives of Virology*, 142(8), 1537–1552.
- Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., ... Stine, S. E. *et al.* (1994). A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(2), 439–443.
- Oka, T., Katayama, K., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.-T., ... Takeda, N. (2006). Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1347–1353.
- Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ushijima, H., ... Takeda, N. (2005). Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *Journal of Virology*, 79(12), 7283–7290.
- Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., & Katayama, K. (2011). Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiology and Immunology*, 55(2), 108–114.
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin.Microbiol.Rev.*, 28(1098–6618 (Electronic)), 32–53.
- Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M., Ogawa, T., Kaiho, I., & Shinozaki, K. (2006). Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes*, 33(2), 157–161.
- Ozawa, H., Kumazaki, M., Ueki, S., Morita, M., & Usuku, S. (2015). Detection and Genetic Analysis of Noroviruses and Sapoviruses in Sea Snail. *Food and Environmental Virology*, 7(4), 325–332.
- Pang, X., Preiksaitis, J., & Lee, B. (2014). Enhanced Enteric Virus Detection in Sporadic Gastroenteritis Using a Multi-Target Real-Time PCR Panel: A One-Year Study. *Journal of Medical Virology*, 86, 1594–1601.
- Pankovics, P., Boros, A., Kiss, T., Delwart, E., & Reuter, G. (2015). Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*). *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 114–121.
- Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., & Day, J. M. (2008). Pathogenesis of type 2 turkey astroviruses with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poult. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 37(2), 193–201.
- Parwani, A. V., Flynn, W. T., Gadfield, K. L., & Saif, L. J. (1991). Serial propagation of porcine enteric calicivirus in a continuous cell line. *Archives of Virology*, 120(1), 115–122.
- Pativada, M., Bhattacharya, R., & Krishnan, T. (2013). Novel human astrovirus strains showing multiple recombinations within highly conserved ORF1b detected from hospitalized acute watery diarrhea cases in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 284–291.
- Pativada, M., Nataraju, S. M., Ganesh, B., Rajendran, K., Ramamurthy, T., Ganguly, S., ... Krishnan, T. (2012). Emerging trends in the epidemiology of human astrovirus infection among infants, children and adults hospitalized with acute watery diarrhea in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1685–1693.
- Pesavento, P., & Murphy, B. (2014). Common and Emerging Infectious Diseases in the Animal Shelter. *Veterinary Pathology*, 51(2), 478-491.
- Phan, T., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R., Lipton, H., & Delwart, E. (2011). The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. (V. Racaniello, Ed.), *PLoS Pathogens*. San Francisco, USA.

- Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., ... Svensen, E. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*, 3(9), 564–575.
- Pratelli, A., & Moschidou, P. (2012). Host range of Canine minute virus in cell culture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(5), 981–985.
- Quan, P. L., Wagner, T. A., Bries, T., Torgerson, T. R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., ... Lipkin, W. I. (2010). Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 918–925.
- Qiu, J., Cheng, F., Johnson, F., Pintel, D. (2007). The transcription profile of the bocavirus bovine parvovirus is unlike of previously characterized parvoviruses. *Journal of Virology*, 81(27), 12080–5.
- Räsänen, S., Lappalainen, S., Kaikkonen, S., Hämäläinen, M., Salminen, M., & Vesikari, T. (2010). Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiology and Infection*, 138(9), 1227–1234. article.
- Reuter, G., Nemes, C., Boros, Á., Kapusinszky, B., Delwart, E., & Pankovics, P. (2012). Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Archives of Virology*, 157(6), 1143–1147.
- Reuter, G., Pankovics, P., Delwart, E., & Boros, Á. (2012). Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary. *Archives of Virology*.
- Reynolds, D. L., Saif, Y. M., & Theil, K. W. (1987). A survey of enteric viruses of turkey poults. *Avian Diseases*, 31(1), 89–98.
- Rivera, R., Nollens, H. H., Venn-Watson, S., Gulland, F. M. D., & Wellehan, J. F. X. (2010). Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *Journal of General Virology*, 91(1), 166–173.
- Rockx, B., de Wit, M., Vennema, H., Vinjé, J., de Bruin, E., van Duynhoven, Y., & Koopmans, M. (2002). Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, 35(3), 246–253.
- Roingard, P. (2008). Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 100(8), 491–501.
- Rosales, S. M., & Thurber, R. L. V. (2013). Metagenomics to discover unknown neurotropic viruses in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) stranded along the Oregon coast. In *IAAAM 44th Annual Conference Proceedings* (pp. 89–90). Sausalito, California.
- Royuela, E., Negrodo, A., & Sanchez-Fauquier, A. (2006). Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *Journal of Virological Methods*, 133(1), 14–19.
- Rubio-Guerri, C., Garcia-Parraga, D., Nieto-Pelegrin, E., Melero, M., Alvaro, T., Valls, M., ... Sanchez-Vizcaino, J. M. (2015). Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis. *BMC Veterinary Research*, 11, 53.
- Saif, L. J., Bohl, E. H., Theil, K. W., Cross, R. F., & House, J. A. (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(1), 105–111.
- Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., & Chiba, S. (2001). Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(9), 849–853.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Scheuer, K. A., Oka, T., Hoet, A. E., Gebreyes, W. A., Molla, B. Z., Saif, L. J., & Wang, Q. (2013). Prevalence of porcine Noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2344–2353.
- Schlottau, K., Schulze, C., Bilk, S., Hanke, D., Höper, D., Beer, M., & Hoffmann, B. (2016). Detection of a Novel Bovine Astrovirus in a Cow with Encephalitis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(3), 253–259.
- Sebire, N. J., Malone, M., Shah, N., Anderson, G., Gaspar, H. B., & Cubitt, W. D. (2004). Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant

- recipient. *Journal of Clinical Pathology*, 57(9), 1001–3.
- Shackelton, L., Parrish, C., Truyen, U., & Holmes, E. (2005). *High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, volume 102(2), 379-384.
- Sharp, C., LeBreton, M., Kantola, K., Nana, A., Diffo, J., Djoko, C., ... Simmonds, P. (2010). Widespread infection with homologues of human parvoviruses B19, PARV4, and human bocavirus of chimpanzees and gorillas in the wild. *Journal of Virology*, 84(19), 10289-10296.
- Simmonds, P. (2006). Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other Mammalian positive-stranded RNA viruses. *Journal of Virology*, 80(22), 11124–11140.
- Skinner, B. (2014). *Science And Human Behavior*. Massachusetts: B. F. Skinner Foundation. Obtido de <http://doi.org/10.1037/h0052427>
- Sloots, T., Whiley, D., Lambert, S., & Nissen, M. (2008). Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *Journal of Clinical Virology*, 42(3), 233-243.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinje, J., & Saif, L. J. (2002). Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *Journal of Virology*, 76(20), 10089–10098.
- Smits, S. L., van Leeuwen, M., Kuiken, T., Hammer, A. S., Simon, J. H., & Osterhaus, A. D. M. E. (2010). Identification and characterization of deer astroviruses. *Journal of General Virology*, 91(11), 2719–2722.
- Snodgrass, D. R., & Gray, E. W. (1977). Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. *Archives of Virology*, 55(4), 287–291.
- Soma, T., Nakagomi, O., Nakagomi, T., & Mochizuki, M. (2015). Detection of norovirus and sapovirus from diarrheic dogs and cats in Japan. *Microbiology and Immunology*, 59(3), 123–128.
- Spahn, G., Mohanty, S., & Hetrick, F. (1966). Experimental infection of calves with hemadsorbing enteric (HADEN) virus. *The Cornell Veterinarian*, 56(3), 377-386.
- Species360, Species holding data for the superfamily Pinnipedia (Comunicação Pessoal, 07 de Outubro, 2016).
- Storz, J., Leary, J., Carlson, J., & Bates, R. (1978). Parvoviruses associated with diarrhea in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(5 Pt 2), 624-627.
- Sun, Y., Chen, A., Cheng, F., Guan, W., Johnson, F., Qiu, J. (2009). Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses. *Journal of Virology*, 83(8), 3956-67.
- Takano, T., Takadate, Y., Doki, T., & Hohdatsu, T. (2016). Genetic characterization of feline bocavirus detected in cats in Japan. *Archives of Virology*, 161(10), 2825-2828.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013, December). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tattersall, P. (2003). Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee to create a new Genus in an existing Family. ICTV. Obtido de <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=08c2cca1-62b5-4d7f-1b61-5c53e7bdbc3b&documentId=ff3a1825-c2d6-35dd-aefe-1f1e6a087489>
- Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356(1411), 983–989.
- Thiel, H. J., & König, M. (1999). Caliciviruses: an overview. *Veterinary Microbiology*, 69(1–2), 55–62.
- Tse, H., Chan, W. M., Li, K. S. M., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2012). Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS ONE*, 7(4).
- Tse, H., Chan, W. M., Tsoi, H. W., Fan, R. Y. Y., Lau, C. C. Y., Lau, S. K. P., ... Yuen, K. Y. (2011). Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. *Journal of General Virology*, 92(8), 1888–1898.
- Tzipori, S., Menzies, J. D., & Gray, E. W. (1981). Detection of astrovirus in the faeces of red deer. *The Veterinary Record*, 108(13), 286.

- Ueki, Y., Shoji, M., Okimura, Y., Miyota, Y., Masago, Y., Oka, T., ... Omura, T. (2010). Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiology and Immunology*, 54(8), 483–486.
- van Hemert, F. J., Lukashov, V. V., & Berkhout, B. (2007). Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Virology Journal*, 4, 25.
- Videira, A. (2001). *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*. Lousã: Lidel - edições técnicas, lda.
- Vu, D.-L., Cordey, S., Brito, F., & Kaiser, L. (2016). Novel human astroviruses: Novel human diseases? *Journal of Clinical Virology*, 82, 56–63.
- Wang, C., Lan, X., & Yang, B. (2016). Molecular Epidemiological Investigation of *Porcine kobuvirus* and Its Coinfection Rate with PEDV and SaV in Northwest China. *BioMed Research International*, 1–6.
- Wang, Q.-H., Han, M. G., Funk, J. A., Bowman, G., Janies, D. A., & Saif, L. J. (2005). Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5963–5972.
- Wang, Q., Zhang, Z., Saif, L.J. (2012). Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology* 78:3932–3940.
- Wang, Q.-H., Souza, M., Funk, J. A., Zhang, W., & Saif, L. J. (2006). Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2057–2062.
- Wellehan Jr, J. F. X. W. (2010). *Discovery, phylogenetic analysis, diagnostic test development and surveillance of the astroviruses of marine mammals*. A dissertation presented to the Graduate School of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Florida.
- Willcocks, M. M., Ashton, N., Kurtz, J. B., Cubitt, W. D., & Carter, M. J. (1994). Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *Journal of Virology*, 68(9), 6057–6058.
- Willcocks, M. M., & Carter, M. J. (1992). The 3' terminal sequence of a human astrovirus. *Archives of Virology*, 124(3), 279–289.
- Williams, F. P. (1980). Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups. *Archives of Virology*, 66(3), 215–226.
- Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Gründel, A., Schwarz, B.-A., Hänel, I., & Otto, P. H. (2012). Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Archives of Virology*, 157(8), 1499–1507.
- Wolf, S., Reetz, J., & Otto, P. (2011). Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Archives of Virology*, 156(7), 1143–1150.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., ... Yuen, K. Y. (2014). Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. *Virology*, 471–473, 117–125.
- Woode, G. N., & Bridger, J. C. (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical Microbiology*, 11(4), 441–452.
- Woolhouse, M. E. J., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1842–1847.
- Wunderli, W., Meerbach, A., Guengoer, T., Berger, C., Greiner, O., Caduff, R., T... Tapparel, C. (2011). Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS ONE*, 6(11).
- Xiao, C.-T., Gimenez-Lirola, L. G., Gerber, P. F., Jiang, Y.-H., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *The Journal of General Virology*, 94(Pt 3), 570–582.
- Yamaguchi, S., Imada, T., & Kawamura, H. (1979). Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. *Avian Diseases*, 23(3), 571–581.
- Yan, H., Abe, T., Gia Phan, T., Anh Nguyen, T., Iso, T., Ikezawa, Y., ... Ushijima, H. (2005). Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *Journal of Medical*

Virology, 75(3), 475–481.

- Yang, S., Wang, Y., Li, W., Fan, Z., Jiang, L., Sun, Z., ... Deng, X. (2016). A novel bocavirus from domestic mink, China. *Virus Genes*. Publicação online: 12 Agosto 2016. Obtido de <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=704d497a-0d6b-f67b-007c-8570f86db85f&documentId=12c8d16a-f763-3b46-a601-927f64af1dc0>.
- Yang, W., Yu, J., Li, J., Cheng, W., Huang, C., Duan, Z. (2012) Genome characterization of a novel porcine bocavirus. *Archives of Virology*, 157(11), 2125-2132.
- Yokoyama, C. C., Loh, J., Zhao, G., Stappenbeck, T. S., Wang, D., Huang, H. V., ... Thackray, L. B. (2012). Adaptive immunity restricts replication of novel murine astroviruses. *Journal of Virology*, 86(22), 12262–12270.
- Yokoyama, M., Oka, T., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Katayama, K., ... Sato, H. (2012). Structural Basis for Specific Recognition of Substrates by Sapovirus Protease. *Frontiers in Microbiology*, 3, 312.
- Yoshida, T., Kasuo, S., Azegami, Y., Uchiyama, Y., Satsumabayashi, K., Shiraishi, T., ... Oka, T. (2009). Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *Journal of Clinical Virology*, 45(1), 67–71.
- Yu, J., Li, D., Xu, Z., Cheng, W., Zhang, Q., Li, H., ... Duan, Z. (2008). Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *Journal of Clinical Virology*, 42(3), 280-285.
- Zeng, S., Wang, D., Frang, L., Ma, J., Song, T., Zhang, R. ... Xiao, S. (2011) Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus. *Journal of General Virology*, 92(4), 784-788.
- Zhai, S., Yue, C., Wei, Z., Long, J., Ran, D., Lin, T., ... Yuan, S. (2010). High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Archives of Virology*, 155(8), 1313-1317.
- Zhang, Q., Hu, R., Tang, X., Chen, H., & Wu, B. (2013). Occurrence and investigation of enteric viral infection in pigs with diarrhea in China. *Archives of Virology*, 158, 1631-1636.
- Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Pesavento, P. A., & Delwart, E. (2014). Faecal virome of cats in an animal shelter. *Journal of General Virology*, 95(Pt 11), 2553–2564.
- Zhao, W., Zhu, A. L., Yuan, C. L., Yu, Y., Zhu, C. X., Lan, D. L., ... Hua, X. G. (2011). Detection of astrovirus infection in pigeons (*Columba livia*) during an outbreak of diarrhoea. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 40(4), 361–365.
- Zhou, F., Sun, H., & Wang, Y. (2014). Porcine bocavirus: Achievements in the past five years. *Viruses*, 6(12), 4946-4960.
- Zhu, A. L., Zhao, W., Yin, H., Shan, T. L., Zhu, C. X., Yang, X., ... Cui, L. (2011). Isolation and characterization of canine astrovirus in China. *Archives of Virology*, 156(9), 1671–1675.
- Zhu, H. C., Chu, D. K. W., Liu, W., Dong, B. Q., Zhang, S. Y., Zhang, J. X., ... Guan, Y. (2009). Detection of diverse astroviruses from bats in China. *Journal of General Virology* 90: 883–887.

VIII. ANEXOS

Anexo 1 – Resumo da Comunicação Científica apresentada na 3rd EAZWV Iberian Section Meeting de 11 a 12 de novembro de 2016 no Oceanário de Lisboa

ASTROVIRUS DETECTION IN FECAL SAMPLES OF PINNIPEDS IN A ZOOLOGICAL CONTEXT

Catarina Fogaça^{1,3}, Carla Flanagan², Nuno Urbani², Raquel Fernandes², Joana Silva², Rita Monteiro², Luís Tavares¹, Ana Duarte¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

² Zoomarine, Mundo Aquático, Guia, Portugal

³ Autor: CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária – Avenida da Universidade Técnica 1300-477 Lisboa. Telefone (+351)917919722. Email: a.catarina@campus.ul.pt.

Astroviruses are ssRNA⁺ viruses included in the *Astroviridae* family with high genetic diversity. They infect a wide range of hosts, making it the 3rd most common viral agent of acute diarrhoea in children^{1,2}, following rotavirus and norovirus. The astroviruses are also associated to enteric diseases in young animals like chickens, turkeys, cats and minks^{3,4,5,6}.

In order to collect information regarding Astrovirus in marine mammals, namely pinnipeds, fecal samples from two zoological collections: Zoomarine, Algarve and Vasco da Gama Aquarium, Lisbon were collected and a molecular survey was conducted by conventional PCR, after viral RNA extraction. Pan-astrovirus *primers* targeting the conserved regions of RdRp (viral polymerase), encoded by the ORF1b domain were used with the amplification conditions previously described by Chu *et al.* 2008⁷.

From a total of 20 pinnipeds of four different species (n=8 Cape Fur seals (*Arctocephalus pusillus pusillus*); n= 7 California sea lions (*Zalophus californianus*); n=4 Harbor seals (*Phoca vitulina*); n=1 grey seal (*Halichoerus grypus*), three positive samples were identified (15.7%). The phylogenetic analysis of 41 amino-acidic sequences representative of the two taxonomic genera: *Astrovirus* e *Mamastrovirus*, reveled an independent cluster, included the three Astrovirus Portuguese sequences

This work presents the first report of astrovirus detection on faecal samples from harbour seal (*Phoca vitulina*) and Cape fur seal (*Arctocephalus pusillus pusillus*) species, in a global level and in a zoological context, improving the existing knowledge concerning astrovirus host range. It also prompted to future epidemiological studies regarding viral pathogens in marine mammal populations under human care.

Bibliography:

¹ Vu, D. L., Cordey, S., Brito, F., & Kaiser, L. (2016). Novel human astroviruses: Novel human diseases? *Journal of Clinical Virology*, 82, 56–63.

² Mendenhall, I. H., Smith, G. J. D., & Vijaykrishna, D. (2015). Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study. *Journal of Virology*, 89(14), 6978–6981. Review.

³ De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals: molecular biology genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1529–1544.a

⁴ Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., & Day, J. M. (2008). Pathogenesis of type 2 turkey astroviruses with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poult. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 37(2), 193–201.

⁵ Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Pesavento, P. A., & Delwart, E. (2014). Faecal virome of cats in an animal shelter. *The Journal of General Virology*, 95(Pt 11), 2553–2564.

⁶ Mittelholzer, C., Englund, L., Hedlund, K.-O., Dietz, H.-H., & Svensson, L. (2003). Detection and sequence analysis of Danish and Swedish strains of mink astrovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5192–5194.

⁷ Chu, D.K., Poon, L.L., Guan, Y., Peiris, J.S. (2008). Novel astroviruses in insectivorous bats. *Journal of Virology*, 82 (18), 9107–9114.

Anexo 2 – Modelo de registo das colheitas das amostras fecais recolhidas durante o período de Estágio Curricular no Zoomarine

Registos de Colheitas de Amostras Fecais															
		Código Animal	1ª Colheita	Envio	observações	2ª Colheita	Envio	observações	3ª Colheita	Envio	observações	4ª Colheita	Envio	observações	
Familia Otariidae	<i>Arctocephalus pusillus pusillus</i>	A1													
		A2													
		A3													
		A4													
		A5													
		A6													
		A7													
	<i>Zalophus californianus</i>	Z1													
		Z2													
		Z3													
		Z4													
		Z5													
		Z6													
Familia Phocidae	<i>Phoca vitulina</i>	P1													
		P2													
		P3													
		P4													
		P5													
		P6													
	<i>Halichoerus grypus</i>	H1													
		H2													

Anexo 3 – Quantificação do total de ácidos nucleicos (DNA e RNA) presentes nas amostras em estudo por espectrofotometria

Amostra	RNA (ng/μL)	DNA (ng/μL)
A1	84,5	104,3
A2	160,2	197,7
A3	133,8	167,7
A4	64,9	79,5
A5	88,2	112,3
A6	110,8	142,5
A7	70,3	87,6
A8	96,9	106,8
Z1	75,8	93,7
Z2	67,2	86,5
Z3	89,1	118,5
Z4	91,2	111,7
Z5	128,4	151,6
Z6	195,4	242,9
P1	80,2	102,0
P3	80,1	100,1
P5	124,8	154,8
P6	96,0	121,9
H1	114,3	148,0